

# **Regulation Vaskulärer Funktionen durch den Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Kirsten Jander**

aus Münster

Düsseldorf, März 2020

aus dem IUF-Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Joachim Altschmied

Koreferent: Prof. Dr. Axel Gödecke

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2020

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und diese in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht zu haben. Alle Angaben, die veröffentlichten Schriften entnommen sind, wurden als solche gekennzeichnet.

---

(Kirsten Jander)  
Düsseldorf,

## Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	I
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das kardiovaskuläre System .....	1
1.2 Das Endothel und NO .....	2
1.3 Transkriptionsfaktoren .....	4
1.3.1 Regulation von Transkriptionsfaktoren .....	5
1.3.2 Extranukleäre Funktionen von Transkriptionsfaktoren .....	6
1.4 Die Transkriptionsfaktorfamilien Grainyhead (GRH) und Grainyhead-like (GRHL).....	7
1.4.1 Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3 (GRHL3).....	9
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Material .....	14
2.1.1 Chemikalien.....	14
2.1.2 Geräte .....	14
2.1.3 Kommerziell erworbene Kits, Puffer und Reagenzien .....	15
2.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	17
2.1.5 Plasmide .....	18
2.1.6 Oligonukleotide.....	18
2.1.7 Verwendete Endonukleasen .....	19
2.1.8 Verwendete Antikörper.....	20
2.2 Methoden .....	22
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1.1 Verwendeter Bakterienstamm.....	22
2.2.1.2 Transformation in <i>Escherichia coli</i> .....	22
2.2.1.3 Ansetzen von Bakterienkulturen .....	23
2.2.1.4 Präparative Polymerase-Kettenreaktion .....	23
2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	25
2.2.1.6 <i>Gibson Assembly</i> -Klonierung.....	25
2.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA .....	26
2.2.1.8 Restriktionsverdau .....	27
2.2.1.9 DNA-Elution aus Agarosegelen .....	27
2.2.1.10 Plasmidsequenzierung.....	27
2.2.2 Zell- und proteinbiochemische Methoden.....	28
2.2.2.1 Kultivierung humaner primärer Nabelschnur-Endothelzellen .....	28

2.2.2.2 Kultivierung humaner embryonalen Nierenzellen .....	28
2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer .....	29
2.2.2.4. Transiente Transfektion von humanen primären Nabelschnur- Endothelzellen mit SuperFect® .....	29
2.2.2.5 Transiente Transfektion der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T mit Lipofectamine® .....	29
2.2.2.6 Zellernte und –lyse.....	30
2.2.2.7 Fraktionierung von Zellkern und Zytoplasma .....	31
2.2.2.8 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode .....	31
2.2.2.9 Luziferase-Reportergen-Assay .....	32
2.2.2.10 Immunpräzipitation von HUVEC-Lysaten.....	33
2.2.2.11 Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE) .....	34
2.2.2.12 Proteindetektion mittels Western Blot .....	35
2.2.2.13 Immunfluoreszenz.....	36
2.2.2.14 <i>Proximity Ligation Assay</i> .....	37
2.2.3 Versuche am <i>in vivo</i> Mausmodell.....	38
2.2.3.1 Herkunft und Haltung von Mäusen.....	38
2.2.3.2 <i>En face</i> Immunfärbung.....	38
2.2.3.3 <i>En face Proximity Ligation Assay</i> .....	39
<b>3 Ergebnisse</b> .....	40
3.1 Verifizierung der potentiellen Interaktionspartner NONO und SFPQ.....	40
3.1.1 Test der NONO- und SFPQ-Antikörper im Immunoblot.....	41
3.1.2 Test der NONO- und SFPQ-Antikörper in der Immunfluoreszenz .....	42
3.1.3 Co-Immunpräzipitation von NONO und SFPQ mit GRHL3 .....	43
3.1.4 GRHL3 und NONO interagieren <i>ex vivo</i> .....	44
3.2 Regulation der transkriptionellen Aktivität von GRHL3 durch Thioredoxin-1 ...	46
3.3 Extranukleäre Funktionen von GRHL3 und Interaktion mit eNOS.....	49
3.3.1 Intrazelluläre Lokalisation der NLS-defizienten Mutante .....	49
3.3.2 Herstellung eines Expressionsvektors für die GRHL3-Deletionsmutante GRHL3-ΔC5.....	52
3.3.3 Transkriptionsaktivierung durch NLS-defiziente GRHL3-Deletionsmutanten .....	54
3.3.4 Auswirkung von GRHL3-ΔbiNLS auf Endothelzellapoptose.....	57
3.3.5 Interaktion von GRHL3 und endothelialer NO-Synthase (eNOS).....	58
3.4 Expression von GRHL3 <i>in vivo</i> .....	62
3.4.1 Expression von GRHL3 in unterschiedlichen Gefäßbetten der Maus.....	62

3.4.2 Einfluss fettreicher Ernährung auf die Expression von GRHL3 <i>in vivo</i> .....	66
3.4.3 Interaktion zwischen GRHL3 und eNOS <i>in vivo</i> .....	68
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>70</b>
4.1 Regulation von GRHL3 durch Protein-Protein-Interaktion .....	70
4.2 Regulation der Transkriptionsaktivität von GRHL3 durch Thioredoxin-1 .....	72
4.3 Nukleäre Lokalisation von GRHL3 .....	73
4.4 Extranukleäre Funktionen von GRHL3 .....	74
4.5 Expression von GRHL3 <i>in vivo</i> .....	77
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>80</b>
<b>Summary</b> .....	<b>81</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>82</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>89</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

(GRHL3mut RE) <sub>2</sub> LUC	Luziferase Reportergenplasmid mit mutierter GRHL3-Bindestelle ( <i>response element</i> )
(GRHL3wt RE) <sub>2</sub> LUC	Luziferase Reportergenplasmid mit wildtypischer GRHL3-Bindestelle ( <i>response element</i> )
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AD	Aktivierungsdomäne
Akt1, -2	Proteinkinase B $\alpha$ , - $\beta$
AMP	Adenosinmonophosphat
AmpR	Ampicillinresistenzgen
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl2	<i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOM	<i>Brother-of-Mammalian Grainyhead</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD45	<i>Cluster of Differentiation 45</i>
Cdk1	<i>Cyclin-dependent Kinase 1</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
CMV-P	CMV-Promotor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindedomäne
DD	Dimerisierungsdomäne
dH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBM	<i>Endothelial Basal Medium</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat

EIF3L	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit L</i>
Elf-1	<i>E74-like Factor 1</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPHA6	Ephrin Typ A Rezeptor 6
ERK5	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 5</i>
<i>et al.</i>	<i>et alias</i> (und andere)
EZ	Endothelzellen
FCS	Fötales Kälberserum
FL	<i>Full-length</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Guanylyl-Cyclase
Gly	Glycin
GMZ	Glatte Muskelzellen
GRH	<i>Grainyhead</i>
GRHL1-3	<i>Grainyhead-like 1-3</i>
GRIM-19	<i>Gene Associated with Retinoic and Interferon-Induced Mortality-19 Protein</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEK293T	<i>Human Embryonic Kidney 293T Cells</i>
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl) Piperazine-1-Ethanesulfonic Acid</i>
Hif1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
HSPA5	<i>Heat Shock Protein Family A5</i>
HSPA9	<i>Stress-70 Protein, mitochondrial</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IAP	<i>Intracisternal A Particles</i>
IEL	Interne elastische Lamina
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
InR	Insulinrezeptor
INSM1	<i>Insulinoma-Associated Antigen 1</i>
IP	Immunpräzipitation
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of Kappa B</i>
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
km	Kilometer
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LMO4	<i>LIM Domain Only 4</i>
LV	Leervektor
m	Meter
M/mol	molar

MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEK5	<i>MAPK-Kinase 5</i>
MEP	Myo-endotheliale Projektionen
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MGR	<i>Mammalian Grainyhead</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOMP	<i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
MP	Magermilchpulver
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
Myc	<i>V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NeoR	Neomycinresistenzgen
NES	Normales Eselserum
NeuroD/β2	<i>Neurogenic Differentiation Factor D/β2</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
ng	Nanogramm
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NONO	<i>Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
NTF-1	<i>Neuronal Transcription Factor-1</i>
NZS	Normales Ziegenserum
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p.a.	<i>pro analysis</i>
p21	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PKG	Protein-Kinase G
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
pmol	Pikomol
POU2F1, -2/OTF-1, -2	<i>POU Domain, Class 2, Transcription Factor 1, -2</i>
PPi	Phosphat
Pro	Prolin
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACK1	<i>Receptor of Activated C Kinase 1</i>
RLB	<i>Reporter Lysis Buffer</i>
RLU	<i>Relative Light Units</i>

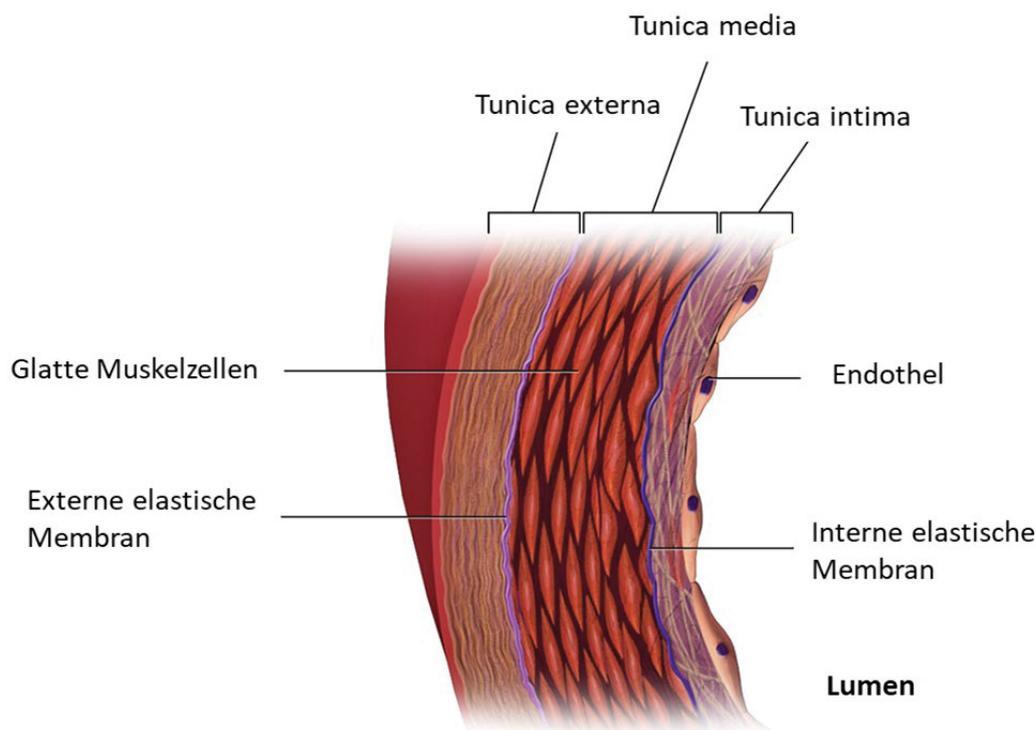
RNA	Ribonukleinsäure
RRM	<i>RNA-Recognition Motif</i>
S	Svedberg
SDS	Natrium-Dodecyl Sulfat
SFPQ	<i>Splicing Factor, Proline- and Glutamine-Rich</i>
SNP	Natrium-Nitroprussid
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolite Repression</i>
SOM	<i>Sister-of-Mammalian Grainyhead</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SV40	Simian Virus 40
SV40-P	SV40 <i>early</i> Promotor
TAE	Tris-Acetat EDTA
TATA-Box	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin-Box
TBP	TATA-Bindungsprotein
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline with Tween</i>
TCF3/E47	<i>Transcription Factor 3</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TFIIA,-B,-D,-E,-H	Transkriptionsfaktor für Polymerase II, Faktor A, -B, -E, -H
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
TP53	Tumorsuppressor p53
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Trx-1	Thioredoxin-1
U	<i>Unit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
v-ATPase	Vakuoläre ATPase
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR1 und 2	VEGF-Rezeptor 1 und 2
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
xg	x-fache der Erdbeschleunigung

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kardiovaskuläre System

Das menschliche Herz pumpt jeden Tag ca. 7.000 Liter Blut durch den Körper. Die darin transportierten Nährstoffe sowie Sauerstoff werden über ein gigantisches, insgesamt etwa 100.000 km langes Netz aus Blutgefäßen im Organismus verteilt. Zunächst wird das Blut in der Lunge mit Sauerstoff angereichert und über die linke Herzkammer in die Aorta gepumpt und zu den Organen transportiert. Im weiteren Verlauf verzweigen sich die Gefäße immer weiter und verjüngen sich dabei weiter zu Arterien und Arteriolen. In den kleinsten Gefäßen, den Kapillaren, findet schließlich die Abgabe von Sauerstoff und Nährstoffen ins Gewebe statt. Gleichzeitig nimmt das Blut Kohlenstoffdioxid und Stoffwechselabbauprodukte auf und transportiert diese über Venen zurück zum Herzen und zur Lunge, wo es wieder mit Sauerstoff angereichert wird.

Es gibt strukturelle Unterschiede im Aufbau der Arterien und der Venen. Die arterielle Gefäßwand ist in drei Schichten unterteilt, die *Tunica intima*, die *Tunica media* und die *Tunica externa* (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Aufbau der arteriellen Gefäßwand.** Bild modifiziert nach Bruce Blaus [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen\\_0055\\_ArteryWallStructure.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0055_ArteryWallStructure.png). Lizenz zur freien Nutzung: Creative Commons Attribution 3.0 Unported License <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode>

Angrenzend an das Lumen liegt die einlagige Endothelzellschicht unterlegt von lockerem Bindegewebe (*Tunica intima*). Die *Tunica intima* wird durch die interne elastische Membran von den darunter liegenden Schichten glatter Muskelzellen und elastischen Fasern, der *Tunica media*, getrennt. Die glatten Muskelzellen liegen dabei ringförmig um das Lumen angeordnet. Die äußerste Schicht der Gefäßwand, die *Tunica externa*, ist ein Bindegewebe bestehend aus kollagenproduzierenden Fibroblasten, die die Elastizität und Stabilität der Arterie bestimmen. Dabei haben größere Gefäße, wie etwa die Aorta, eine dickere Schicht aus Fibroblasten, sodass das Gefäß elastisch ist und sich schnell an sich verändernde Blutvolumina anpassen kann. Hingegen verfügen die kleinsten Arterien, die Kapillaren, weder über eine Muskel- noch eine Bindegewebsschicht, was sie ideal für den Gas- und Stoffaustausch mit dem umliegenden Gewebe macht.

Venen, die das sauerstoffarme Blut von den Organen zurück zum Herzen und zur Lunge transportieren, haben eine sehr dünne Muskelzellschicht und sind sehr elastisch. Um ein Zurückfließen des Bluts zu verhindern, sind sie mit Venenklappen ausgestattet, die wie Rückschlagklappen wirken und so einen kontinuierlichen Blutfluss in eine Richtung ermöglichen.

## 1.2 Das Endothel und NO

Das Endothel besteht aus einer einzigen Schicht von Plattenepithelzellen, die das Innere von Blut- und Lymphgefäßen auskleiden und in direktem Kontakt mit den transportierten Flüssigkeiten stehen. In den Blutgefäßen dient es zum einen als Barriere zwischen Blutfluss und umliegendem Gewebe, zum anderen nimmt es die im Blut transportierten Nährstoffe und Sauerstoff auf und gibt Stoffwechselabbauprodukte und Kohlendioxid wieder ab. Darüber hinaus ist das Endothel noch an weiteren wichtigen Vorgängen beteiligt, wie der Regulation des Gefäßtonus, der Gefäßneubildung aus bereits bestehenden Gefäßen (Angiogenese) sowie der Hämostase. In all diesen Prozessen spielt endotheliales Stickstoffmonoxid (NO) eine wesentliche Rolle, was unterstreicht, wie essentiell die NO-Bioverfügbarkeit im Endothel für das Gefäß ist.

NO wird in den Endothelzellen von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin produziert, wobei die Aktivität von eNOS durch Phosphorylierung reguliert wird. Dabei stellt die aktivierende Phosphorylierung an Serin 1177 die hauptsächlich positive Modulation der Enzymaktivität dar, wohingegen die Phosphorylierung an Threonin 495 die enzymatische Aktivität reduziert <sup>1</sup>.

Durch das Freisetzen von Endothelin in die angrenze Schicht aus glatten Muskelzellen werden diese zur Kontraktion angeregt und das Gefäß verengt sich, ein Vorgang, der als Vasokonstriktion bezeichnet wird <sup>2</sup>. Für die Vasodilatation, also der Erweiterung der Blutgefäße durch Relaxation der Muskelzellen, können Endothelzellen NO freisetzen.

Auch bei der Angiogenese, der Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen, spielen das Endothel und NO eine zentrale Rolle. Im erwachsenen Menschen findet Angiogenese unter physiologischen Bedingungen bei der Wundheilung und im Uterus während des Menstruationszyklus statt. Unter pathologischen Bedingungen sorgt Angiogenese für eine Reperfusion des Gewebes nach Ischämie oder begünstigt Wachstum und Metastasierung von Tumoren. Wesentlicher Stimulus zur Initiierung der Angiogenese ist der Wachstumsfaktor VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*): er bindet an den Endothelzellen an den VEGF-Rezeptor 1 und 2 (VEGFR1 und -R2), woraufhin die eNOS aktiviert wird<sup>3</sup>. Das freigesetzte NO löst anschließend die Vasodilatation aus und Matrix-Metalloproteasen bauen die extrazelluläre Matrix zwischen den Endothelzellen ab und permeabilisieren somit das Endothel. Dadurch wird Platz gemacht für das so genannte *Sprouting*, bei dem aktivierte Endothelzellen polarisiert werden und Filopodien ausbilden. Diese *Tip*-Zellen genannten Endothelzellen sind dann in der Lage, durch Migration eine Grundlage für neue Blutgefäße zu bilden. Gleichzeitig bilden sich Stiel-Zellen, die proliferieren und damit letztendlich das neue Blutgefäß ausbilden können. In allen Schritten während der Angiogenese, der Vasodilatation sowie der Proliferation und Migration der Endothelzellen, spielt NO eine zentrale Rolle<sup>3</sup>.

Von Endothelzellen gebildetes NO erfüllt neben seiner Funktion in der Vasodilatation und der Angiogenese weitere Aufgaben. Wird es in das Gefäßlumen sezerniert, inhibiert es die Adhäsion und Aggregation von Monozyten und Blutplättchen an die Gefäßwand, um der Bildung von Blutgerinnseln entgegenzuwirken. Diese spielen bei der Blutstillung nach Verletzung des Gefäßes, der Hämostase, eine entscheidende Rolle. Das Endothel nimmt hier eine antikoagulative Rolle ein und trägt damit zur Aufrechterhaltung der Balance zwischen pro- und antikoagulativen Systemen bei. Ist die Bildung von Blutgerinnseln zur Wundheilung noch sinnvoll, kann sie bei einem Ungleichgewicht der Systeme zum Gefäßverschluss und somit zu Thrombosen oder Infarkten führen.

Daneben wirkt NO antiapoptotisch. In Endothelzellen, die mit dem apoptoseinduzierenden *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) behandelt wurden, wirkt NO inhibierend auf Apoptose. Diese Inhibition wird durch eine S-Nitrosierung an Cystein 163 in der p17-Untereinheit der Caspase 3<sup>4</sup> vermittelt; einer Cystein-Protease, die während der Effektorphase der Apoptose proteolytisch aktiviert wird<sup>5</sup>. Auch in alternden Zellen spielt die Bioverfügbarkeit von NO eine zentrale Rolle bei der Inhibition von Apoptose. Studien mit TNF $\alpha$ -behandelten, alternden Endothelzellen (Passage 14) wiesen eine höhere Apoptoserate als junge Zellen (Passage 3) auf. Gleichzeitig sanken die Proteinbiosynthese und aktivierende Phosphorylierung der eNOS, was eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit in der Zelle zur Folge hat<sup>6</sup>. Die Apoptoseinduktion konnte durch eine Behandlung mit einem NO-Donor rückgängig gemacht werden<sup>6</sup>, was darauf hinweist, dass eine geringere NO-Bioverfügbarkeit in alternden Zellen diese sensibler gegenüber apoptoseinduzierenden Stimuli macht.

Durch die vielfältigen Aufgaben, die das Endothel erfüllt, wird deutlich, wie wichtig die Erhaltung endothelialer Funktionalität für die Gesundheit der Blutgefäße und zur

Prävention kardiovaskulärer Krankheiten ist. Verliert das Endothel seine Funktionalität, spricht man von endothelialer Dysfunktion, die wesentlich zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt <sup>7</sup>.

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die weltweit führenden Todesursachen dar ([https://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death/top\\_10/en/](https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/)), wobei jedes Jahr etwa 17 Millionen Menschen direkt oder indirekt an den Folgen, besonders an Herzinfarkten und Schlaganfällen sterben (<http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/cardiovascular-diseases2>).

Eine ausgewogene, gesunde Ernährung, regelmäßige Bewegung sowie Abstinenz von Rauchen und Alkohol haben einen nachgewiesenen positiven Effekt auf das Herz und die Blutgefäße und können so maßgeblich zur Prävention dieser Erkrankungen beitragen <sup>8, 9</sup>. Einen nicht beeinflussbaren Faktor stellt allerdings das Alter dar. Alterung ist ein chronobiologischer Prozess, der die abnehmende Fähigkeit eines Organismus, sich veränderten Umweltbedingungen anzupassen, beschreibt. Allgemein stellt das Alter den größten unabhängigen Risikofaktor dar, Herz-Kreislaufkrankungen zu entwickeln <sup>10, 11</sup>.

### 1.3 Transkriptionsfaktoren

Zellen müssen ständig diverse interne und externe Stimuli verarbeiten und entsprechend auf sie reagieren. Der Ablauf verschiedenster intrazellulärer biologischer Prozesse wird dabei über ein verändertes Transkriptom reguliert, d. h. das Expressionsprofil gerade benötigter Proteine und regulatorischer RNAs, die von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II transkribiert werden, wird immer wieder angepasst und verändert. Die korrekte Transkription spezifischer Gene wird über ein komplexes Zusammenspiel von generellen und sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren, Co-Faktoren sowie die Chromatinstruktur reguliert <sup>12</sup>.

Generelle Transkriptionsfaktoren werden für jeden von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II durchgeführten Transkriptionsvorgang benötigt. Einer dieser generellen Transkriptionsfaktoren ist TFIID (Transkriptionsfaktor für Polymerase II, Faktor D), der aus einer Reihe anderer allgemeiner Transkriptionsfaktoren (TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIH), als einziger DNA erkennen und binden kann. TFIID erkennt mithilfe einer seiner Untereinheiten, dem TATA-Bindungsprotein (TBP) die TATA-Box in der Promotorregion eines Gens und rekrutiert die RNA-Polymerase II sowie weitere allgemeine Transkriptions- und Co-Faktoren an die DNA <sup>13</sup>.

Anders als generelle Transkriptionsfaktoren sind sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren modular aufgebaut und verfügen über eine DNA-Bindedomäne zur sequenzspezifischen DNA-Erkennung sowie weitere Domänen zur Transkriptionsaktivierung bzw. -repression und der Regulation ihrer Aktivität oder subzellulären Lokalisation <sup>14</sup>. Die Anordnung der Domänen in den Proteinen ist nicht streng festgelegt und kann variieren. Außerdem kann ein Protein mehrere

Aktivierungs- bzw. Repressions- und Regulationsdomänen haben, aber immer nur eine einzige DNA-Bindedomäne. Anhand der hochkonservierten Struktur ihrer DNA-Bindedomänen werden sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren in Säugetieren in mehrere große Klassen eingeteilt <sup>12, 15, 16</sup>.

Aktivierungsdomänen hingegen sind nicht strukturell konserviert, sind aber durch saure, prolin- oder glutaminreiche Aminosäuresequenzen gekennzeichnet <sup>17</sup>. Entsprechende Untersuchungen zu Repressionsdomänen fehlen hingegen. Regulatorische Domänen in Transkriptionsfaktoren sind je nach den Signalwegen, über die die Aktivität der jeweiligen Transkriptionsfaktoren reguliert wird, extrem divers und reichen von Ligandenbindungsdomänen, wie z.B. in den nukleären Hormonrezeptoren <sup>18</sup>, bis hin zu Degradationsdomänen, wie z.B. im *Hypoxia-inducible Factor 1α* (Hif1α) <sup>19</sup>.

Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren können mithilfe der Aktivierungs- bzw. Repressionsdomänen mit generellen Transkriptionsfaktoren und/oder Modulatoren der Chromatinstruktur interagieren und so Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie an Promotorregionen von Zielgenen rekrutieren <sup>20</sup>. Die Kombination verschiedener Transkriptionsfaktoren sowie deren Aktivierungszustand bestimmt die spatiotemporale Aktivierung der Transkription spezifischer Gene <sup>21</sup>.

### 1.3.1 Regulation von Transkriptionsfaktoren

Da Transkriptionsfaktoren durch die Regulation multipler Zielgene pleiotrope Effekte haben, können sie das zelluläre Transkriptom je nach internen und externen Stimuli sehr schnell ändern. Um eine Anpassung an physiologische oder pathologische Stimuli zu gewährleisten, unterliegen sie komplexen Regulationsmechanismen. Diese beinhalten die Regulation ihrer Expression, mRNA-Spleißen und -Stabilität, -Translation sowie multiple posttranslationale Modifikationen (PTMs), die sich auf die subzelluläre Lokalisation, Stabilität, DNA-Bindung, Transaktivierungskapazität sowie Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren und Co-Regulatoren auswirken. Zu den gängigsten PTMs gehören Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Acetylierung, SUMOylierung Methylierung und Glykosylierung <sup>22</sup>, aber auch die Regulation des Oxidationsstatus von Cysteinseitenketten <sup>23</sup>.

Einige der PTMs können an den gleichen Aminosäureresten stattfinden und sich daher auch gegenseitig ausschließen. Umgekehrt können manche PTMs, hauptsächlich Phosphorylierungen, die Voraussetzungen für andere Modifikationen sein. Je nach Position im Protein und Menge können Phosphorylierungen vielfältige Auswirkungen haben, etwa auf Stabilität, subzelluläre Lokalisation, Protein-Protein-Interaktionen und DNA-Bindeaffinität <sup>24</sup>. Phosphorylierungen können von einer Vielzahl von Kinasen ausgeführt werden, von denen es über 500 gibt <sup>25</sup>. Das enzymatische Repertoire für die anderen PTMs hingegen ist relativ begrenzt. Ubiquitinierungen und SUMOylierungen werden von wenigen strukturell verwandten aktivierenden und konjugierenden Enzymen sowie Ubiquitin- bzw. SUMO-Ligasen durchgeführt <sup>26, 27</sup>.

Durch Ubiquitinierung wird das Polypeptid häufig zum proteasomalen Abbau markiert<sup>24</sup>. Acetylierung und Deacetylierung werden von Acetyltransferasen bzw. Deacetylasen katalysiert, von denen es jeweils drei Familien bzw. Klassen gibt<sup>28</sup>. Acetylierungen eines Transkriptionsfaktors resultieren häufig in eine erhöhte DNA-Bindung<sup>29</sup>. Ein Großteil der Transkriptionsfaktoren wird durch Anhängen eines einzigen *N*-Acetylglukosaminrestes über eine O-glykosidische Bindung modifiziert, was als O-GlcNAcylierung bezeichnet wird und diese Acylierung tritt als Konsequenz eines einzigen Biosyntheseweges auf<sup>22</sup>. Für die Oxidation und Reduktion von Proteinen stehen mehrere zelluläre Oxidoreduktasen zur Verfügung, allerdings ist Thioredoxin-1 einer der wesentlichen Regulatoren von Transkriptionsfaktoren. Viele dieser Transkriptionsregulatoren sind sensitiv gegenüber der Oxidation von Cysteinresten in ihrer DNA-Bindedomäne. Über sein redoxaktives Zentrum mit den Cysteinen 32 und 35 ist Thioredoxin-1 in der Lage, diese Transkriptionsfaktoren zu reduzieren und damit zu aktivieren, wobei es selbst oxidiert wird und durch Thioredoxin-1-Reduktase wieder reduziert werden kann<sup>23</sup>.

Transkriptionsfaktoren sind in der Lage, mit anderen Transkriptionsfaktoren aus der eigenen oder einer verwandten Familie Homo- oder Heterodimere zu bilden und so ihre Aktivität zu beeinflussen. Abhängig vom Dimerisierungspartner kann durch die Dimerisierung die DNA-Erkennung geändert werden, was in die Bindung unterschiedlicher Zielgene resultiert<sup>24</sup>. Die Heterodimerisierung mit verschiedenen Co-Faktoren kann sich wiederum repressiv oder stimulierend auf die Aktivität eines Transkriptionsfaktors auswirken. Andere Transkriptionsfaktoren werden über Interaktion mit Inhibitoren an der Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern gehindert<sup>30</sup>.

### 1.3.2 Extranukleäre Funktionen von Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren wurden primär anhand ihrer Aufgabe in der Transkriptionskontrolle im Zellkern charakterisiert. Um ihrer Aufgabe als Transkriptionsaktivator nachgehen zu können, müssen Transkriptionsfaktoren bei Bedarf in der Lage sein, in den Zellkern zu translozieren. Dafür besitzen Proteine ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), das von Transportproteinen der Kernporenkomplexe, den Importinen, erkannt wird. Das NLS besteht typischerweise aus basischen Aminosäuren, die aus einer einteiligen (*monopartite*) oder einer zweiteiligen (*bipartite*) Abfolge bestehen können. Bei der zweiteiligen Abfolge liegen die Sequenzen mit basischen Aminosäuren etwa 10-12 Aminosäuren weit auseinander<sup>31, 32</sup>. Allerdings zeigte sich später, dass zumindest einige Vertreter dieser regulatorischen Proteine auch extranukleäre Funktionen haben können.

Ein prominenter Vertreter dieser Transkriptionsfaktoren ist der Tumorsuppressor p53 (TP53). Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie dem Entstehen von DNA-Schäden oder oxidativen Stress, aktiviert p53 die Transkription von Genen, die u.a. für Proteine codieren, die Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren können<sup>33</sup>. Eine

mutierte Variante von p53, bei der die Transkriptionsfaktoraktivität durch vollständige bzw. teilweise Deletion der Transaktivierungsdomäne bzw. der DNA-Bindedomäne aufgehoben wurde, konnte weiterhin Apoptose induzieren<sup>34</sup>. Diese Beobachtung wurde durch weitere Studien bestätigt, bei denen eine Reihe von Transaktivierungsdefizienten p53 Mutanten unabhängig von der Transkriptionsaktivierung von Zielgenen Apoptose auslösen konnten<sup>35</sup>.

Bei einem weiteren Beispiel handelt es sich um *Insulinoma-associated Antigen 1* (INSM1), einen Zink-Finger Transkriptionsfaktor, der wichtig für die Differenzierung pankreatischer endokriner Zellen ist. Als Repressor unterdrückt INSM1 die Transkription von *Neurogenic Differentiation Factor D/beta 2* (NeuroD/ $\beta$ 2), einem Transkriptionsfaktor für Insulin, und Insulin selbst<sup>36</sup>. Im Zytoplasma kann INSM1 an Cyklin D1 binden und so um die Bindung mit der Cyklin-abhängigen Kinase 1 (CdK1) konkurrieren. Als Folge wird ein Zellzyklusarrest induziert<sup>37</sup>. Außerdem kann INSM1 mit *Receptor of Activated C Kinase 1* (RACK1) interagieren. RACK1 bindet an den Insulinrezeptor (InR) und inhibiert dessen Signalkaskade. Durch Interaktion mit INSM1 wird die Bindung zwischen RACK1 und InR unterbrochen, was dazu führt, dass die InR-vermittelte Signalkaskade verstärkt wird<sup>36</sup>.

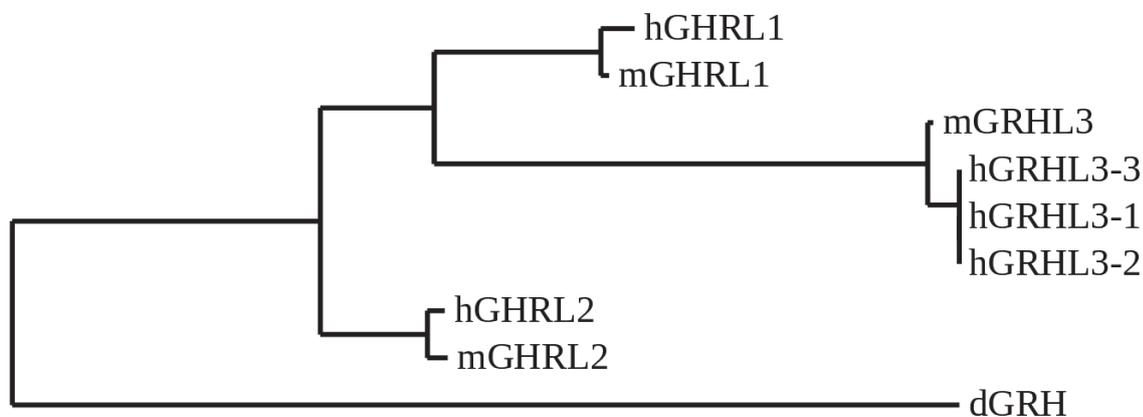
Mitglieder der *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) -Familie sind als Transkriptionsfaktoren in Immunregulation, Entwicklung, Metabolismus, Zelltod und weiteren biologischen Funktionen involviert<sup>38</sup>. In den letzten Jahren wurden insbesondere für ein Mitglied, STAT3, neben den bekannten Aufgaben als Transkriptionsfaktor auch neue Funktionen beschrieben, die außerhalb des Zellkerns stattfinden. Ein kleiner Teil von STAT3 lokalisiert in die Mitochondrien, wo er verstärkend auf die Aktivität von Komplex I und II der Elektronentransportkette wirkt<sup>39, 40</sup> und somit essentielle mitochondriale Funktionen positiv reguliert. Diese positive Regulierung wird möglicherweise durch direkte Interaktion mit *Gene Associated with Retinoic and Interferon-Induced Mortality-19 Protein* (GRIM-19), einer Untereinheit des Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette, vermittelt<sup>41</sup>. Darüber hinaus ist STAT3 an der Regulation der intrazellulären pH-Homöostase beteiligt. Unter sauren zytosolischen Bedingungen wird die Transkriptionsfaktoraktivität von STAT3 unterdrückt; stattdessen assoziiert STAT3 mit der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) und verstärkt deren Aktivität<sup>42</sup>. V-ATPasen nutzen die ATP-Hydrolyse, um Protonen aus dem Zytosol in intrazelluläre Vesikel, insbesondere Endo- und Lysosomen, die der Zelle als Protonenspeicher dienen, zu pumpen.

#### **1.4 Die Transkriptionsfaktorfamilien Grainyhead (GRH) und Grainyhead-like (GRHL)**

Grainyhead (GRH) und seine Säugerhomologe, Grainyhead-like (GRHL) Proteine, umfassen eine Familie von Transkriptionsfaktoren, deren namensgebender Vertreter GRH in der Taufliege *Drosophila melanogaster* identifiziert und beschrieben wurde<sup>43</sup>. GRH ist auch unter den Bezeichnungen *E74-like Factor 1* (Elf-1) und *Neuronal*

*Transcription Factor 1* (NTF-1) bekannt. GRH-defiziente *Drosophila* Fliegen sterben bereits während der Embryogenese und weisen einen abnormalen Phänotyp der Tracheen und eine granuläre Struktur des Exoskeletts in der Kopfreion auf, woher sich die Bezeichnung *grainy head* ableitet<sup>44</sup>.

Es gibt drei Säugetierhomologe zu GRH, nämlich *Mammalian GRH* (MGR) bzw. Grainyhead-like 1 (GRHL1), *Brother-of-MGR* (BOM) bzw. Grainyhead-like 2 (GRHL2)<sup>45, 46</sup> und *Sister-of-MGR* (SOM) bzw. Grainyhead-like 3 (GRHL3)<sup>47</sup>, deren Verwandtschaft in Abbildung 1.2 dargestellt ist. Mitglieder der GRH/GRHL Familie sind modular aufgebaut und bestehen aus einer isoleucinreichen Aktivierungsdomäne, einer hochkonservierten DNA-Bindedomäne sowie einer Dimerisierungsdomäne, mit der sie Homo- und Heterodimere bilden können<sup>47</sup>.



**Abbildung 1.2: Molekular-phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen der Proteine der GRH/GRHL-Familie.** Das Phylogramm wurde anhand der Primärsequenz der Proteine mit dem Online-Tool [www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr) erstellt<sup>48,49</sup>. Die zugrunde gelegten Proteinsequenzen sind die Translationsprodukte folgender Transkripte: dGRH: NM\_057494, hGRHL1: NM\_198182, mGRHL1: NM\_001161406, hGRHL2: NM\_024915, mGRHL2: NM\_026496, hGRHL3-1: NM\_021180, hGRHL3-2: NM\_198173, hGRHL3-3: NM\_198174, mGRHL3: NM\_001013756; (h = human; m = murin; d = *Drosophila*).

Während der Embryogenese von Mäusen werden die verschiedenen Mitglieder der GRHL-Familie (GRHL1-3) in verschiedenen Geweben spatiotemporal unterschiedlich exprimiert, was darauf hindeutet, dass die drei Proteine trotz starker Sequenzüberlappung nicht die gleichen Funktionen übernehmen<sup>50</sup>. Dies wurde später durch genetische Komplementationsstudien untermauert<sup>51</sup>. Mithilfe eines *yeast-two hybrid* Assays wurde herausgefunden, dass die Mitglieder der GHRL-Subfamilie untereinander Heterodimere bilden können<sup>47</sup>.

Eine Hauptaufgabe aller Mitglieder der GRH/GRHL-Familie ist die Erhaltung der epidermalen Integrität. Diese ist evolutionär hochkonserviert und lässt sich sowohl in Insekten als auch in Mäusen nachweisen<sup>52,53</sup>. GRH ist essentiell für die Wundheilung in *Drosophila*<sup>54</sup>.

Da GRHL3 im Mittelpunkt dieser Dissertation steht, wird im folgenden Abschnitt näher auf dieses Mitglied der GRHL-Familie eingegangen.

#### 1.4.1 Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3 (GRHL3)

Der Transkriptionsfaktor GRHL3 wurde zuerst anhand seiner Homologie zu den vorher bekannten Säugerproteinen GRHL1 und GRHL2 <sup>47</sup>, sowie Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors *LIM Domain Only 4* (LMO4) in einem *yeast-two-hybrid screen* <sup>55</sup> gefunden. Unabhängig davon wurde es später von unserer Arbeitsgruppe in einem Genfallenscreen für TNF $\alpha$ -induzierte apoptoseregulierende Gene identifiziert <sup>56</sup>.

GRHL3 spielt eine wichtige Rolle in der Wundheilung und Zellmigration. So zeigen GRHL3-defiziente Mäuse eine defekte Epitheldifferenzierung, die mit Störungen der Hautbarriere und Wundheilung einhergeht <sup>53</sup>. Zudem kommt es zu einer unvollständigen Entwicklung des Neuralrohrs während der Embryogenese. Dieser Neuralrohrdefekt führt dazu, dass die Mäuse mit einem *spina bifida*-Phänotyp, einem offenen Rücken, geboren werden und kurz nach der Geburt sterben <sup>57</sup>. Daneben weisen diese Tiere einen Defekt im Verschluss der Augenlider auf <sup>58</sup>, der später darauf zurückgeführt wurde, dass GRHL3 eine essentielle Rolle bei der Filopodienausbildung und damit der Keratinozytenmigration spielt <sup>59</sup>. Diese Befunde wurden dadurch erhärtet, dass GRHL3-defiziente Keratinozyten eine verminderte Migrationsrate aufweisen und die Herunterregulation von GRHL3 in einer Keratinozytenzelllinie zum gleichen Effekt führt <sup>60</sup>. Interessanterweise ist auch diese Funktion von GRHL3 spezieübergreifend, da bei der Veränderung der GRHL3-Expression in Zebrafischembryonen Auswirkungen auf migratorische Prozesse beobachtet wurden <sup>61</sup>.

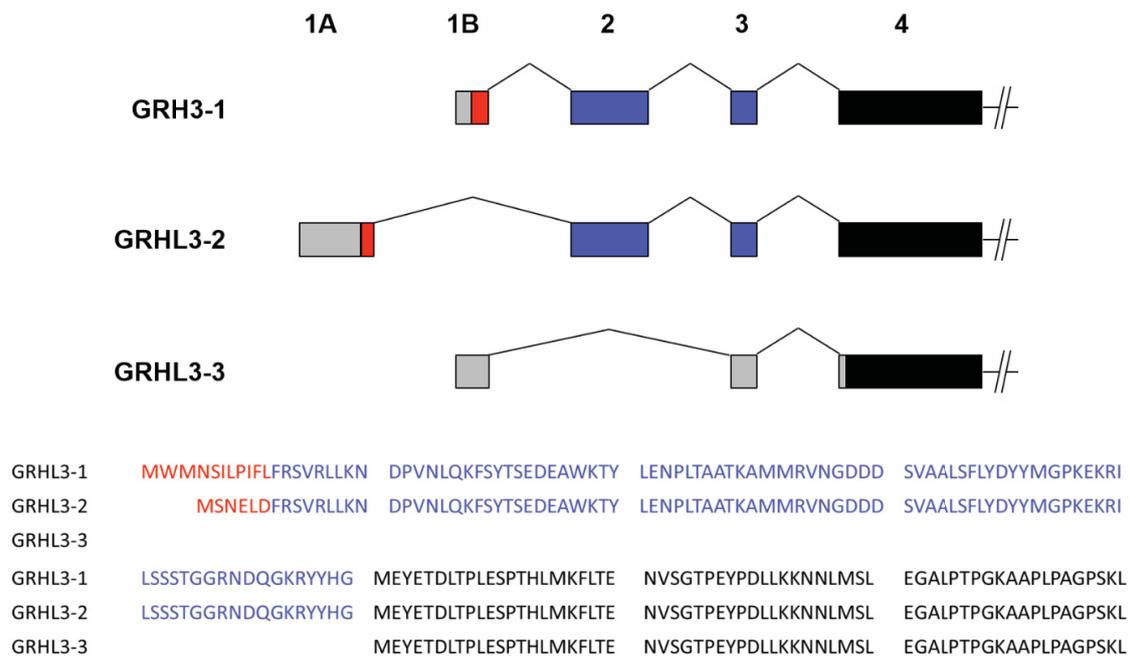
In unserer Arbeitsgruppe konnte erstmals nachgewiesen werden, dass GRHL3 in humanen Endothelzellen exprimiert wird <sup>62</sup>. Auch hier ist GRHL3 an der Zellmigration beteiligt. Überexpression von GRHL3 in primären humanen Endothelzellen führt zu einer Induktion von Migration, die ähnlich stark wie durch den Wachstumsfaktor VEGF induziert wird <sup>56</sup>. Allerdings scheint die GRHL3-induzierte Migration nicht über VEGF vermittelt zu werden, da die Überexpression von GRHL3 keinen Einfluss auf die VEGF-Menge hat <sup>62</sup>. Neben der promigratorischen hat GRHL3 auch eine antiapoptotische Funktion in Endothelzellen <sup>62</sup>.

Da NO sowohl eine Rolle bei der Migration von Endothelzellen als auch ihrem Schutz vor Apoptose spielt, wurde der Zusammenhang zwischen promigratorischen und antiapoptotischen Effekten von GRHL3 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die NO-induzierte Endothelzellmigration von GRHL3 vermittelt wird, da sie durch Herunterregulation von GRHL3 inhibiert wurde. Zudem ist die Inhibition von Apoptose abhängig von NO, da sie durch Zugabe eines eNOS-Inhibitors unterbunden werden konnte. GRHL3 greift auch in die NO-Produktion in Endothelzellen ein, was daran gezeigt wurde, dass eine erhöhte GRHL3-Expression die Phosphorylierung von eNOS an Serin 1177 <sup>63, 64</sup>, einem Surrogatmarker für die Aktivität des Enzyms, verstärkte.

Diese Phosphorylierung der eNOS wird durch die Proteinkinase B $\alpha$  (Akt1) vermittelt<sup>63,64</sup>, auf deren Aktivität GRHL3 ebenfalls eine verstärkende Wirkung hat. So erhöht sich bei Überexpression von GRHL3 die Phosphorylierung von Akt1 an Serin 473, was gleichbedeutend mit der Aktivierung der Kinase ist<sup>65</sup>. Interessanterweise gibt es einen positiven Rückkopplungsmechanismus zwischen GRHL3 und NO. Zum einen ist GRHL3 an der Aktivierung der eNOS und damit an einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO beteiligt, zum anderen führt die Erhöhung des NO-Levels, z.B. durch Zugabe von exogenen NO-Donoren, zu einer Steigerung der GRHL3-Expression<sup>62</sup>.

Im Gegensatz zu anderen Säugern existieren im Menschen drei GRHL3-Isoformen, GRHL3-1 bis 3, von denen Isoform 2 das direkte Homolog zu den GRHL3-Proteinen anderer Spezies darstellt. Auf Transkriptionsebene unterscheiden sich *grhl3-1* und *grhl3-2* nur durch die Nutzung eines alternativen, humanspezifischen ersten Exons, das für die N-terminalen 11 (Isoform 1) bzw. 6 (Isoform 2) Aminosäuren codiert (Abbildung 1.3). *Grhl3-3* hingegen nutzt dasselbe erste Exon wie Isoform 1, allerdings fehlt hier aufgrund von alternativem Spleißen Exon 2, was dazu führt, dass die *grhl3-3*-mRNA für ein N-terminal verkürztes Protein codiert, da ein anderes Translationsinitiationscodon genutzt wird. Basierend auf der ursprünglichen Beschreibung sollte dies zum Verlust der Aktivierungsdomäne führen. Allerdings wurden für diese Untersuchungen nur isolierte Abschnitte der Isoformen 1 und 3 mit der DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 fusioniert und die Aktivierung eines Gal4-Reportergens analysiert<sup>47</sup>. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten dann, dass das intakte GRHL3-3-Protein ein starker Transkriptionsaktivator ist<sup>66</sup>.

Die drei Isoformen werden in verschiedenen Geweben differentiell co-exprimiert; so etwa in Gehirn, Prostata und Niere. Als einzige Isoform wird GRHL3-2 im Thymus und den Tonsillen exprimiert<sup>47</sup>.



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Transkriptstruktur der humanen *Grhl3*-Isoformen.** Gezeigt werden die ersten 4 Exons der Primärtranskripte, wobei die Isoformen 1 und 3 ein humanspezifisches erstes Exon verwenden, währenddessen Exon 1 der Isoform 2 dem Exon anderer Säuger entspricht. Die mRNA für die Isoform 3 stellt ein alternatives Spleißprodukt vom selben ersten Exon der Isoform 1 dar, ist aber durch Ausschneiden des Exons 2 deutlich kürzer. Hinter Exon 4 sind die Transkripte aller Isoformen identisch. Grau unterlegte Bereiche bleiben untranslatiert; farbig bzw. schwarz unterlegte Bereiche werden translatiert. Unten im Bild sind die translatierten Aminosäuresequenzen der einzelnen Isoformen dargestellt. Rot = Aminosäuresequenz von Exon 1A und 1B, blau = identische Aminosäuresequenz der Exons 2 und 3 (bei Isoform 3 nicht vorhanden), schwarz = Aminosäuresequenz von Exon 4.

Auch in humanen Endothelzellen werden alle drei Isoformen co-exprimiert; allerdings haben die beiden Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 unterschiedliche Zielgene im Endothel, was sich bei einer vergleichenden Genexpressionsanalyse zeigte. Unter den 367 von GRHL3-1 und den 261 von GRHL3-3 regulierten Genen werden nur 28 von beiden Isoformen co-reguliert <sup>66</sup>. Auch auf funktioneller Ebene zeigten sich drastische Unterschiede zwischen diesen beiden Isoformen. Wie die Isoform GRHL3-2 <sup>56</sup> fördert GRHL3-1 Endothelzellmigration, inhibiert Apoptose und verstärkt die aktivierende Phosphorylierung von eNOS und Akt1 <sup>66</sup>. Die Aktivierung von Akt1 lässt sich durch die Hochregulation von Akt2 erklären, da diese Proteinisoform alle Akts reguliert <sup>67</sup>. Im Gegensatz dazu inhibiert GRHL3-3 die Zellmigration und hat weder antiapoptotische Wirkung noch aktiviert sie eNOS oder Akt1. Zudem wird der alternative Spleißvorgang, der entweder zur Expression von Isoform 1 oder 3 führt, über Stimuli, die sich auf Endothelzellfunktionen auswirken, reguliert. So verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen den beiden mRNAs hin zu Isoform 1, wenn Endothelzellen mit einem NO-Donor behandelt werden <sup>66</sup>.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden GRHL3-Isoformen 1 und 2 Endothelzellen positiv beeinflussen, wohingegen Isoform 3 einzelne Charakteristika einer Endothelzell dysfunktion zu induzieren scheint. Die reziproken Effekte von GRHL3-1 und -3 wurden - unabhängig von Endothelfunktionen - durch *in vivo* Experimenten am Zebrafisch *Danio rerio* eindrucksvoll untermauert: dort führte eine Überexpression von GRHL3-3 durch Injektion von *in vitro*-translatierter RNA in frühe Embryonen im Gegensatz zu GRHL3-1 zu massiven Entwicklungsstörungen während der Embryogenese <sup>66</sup>.

Bezüglich der Interaktionspartner von GRHL3, seinen posttranslationalen Modifikationen und möglichen Funktionen außerhalb des Zellkerns ist wenig bekannt. GRHL3 wurde unter anderem in einem *yeast-two-hybrid screen* mit dem Transkriptionsfaktor LMO4 gefunden <sup>55</sup>, was eine direkte Interaktion der beiden Proteine nahelegt. Dies konnte durch Immunpräzipitationen aus Zellen, die beide Proteine überexprimierten, auch bestätigt werden. Allerdings zeigten Experimente mit *in vitro*-translatiertem LMO4 und gereinigtem GRHL3, dass die Interaktion nicht direkt ist, sondern dass die beiden Proteine wahrscheinlich Komponenten eines größeren Multiproteinkomplexes sind <sup>58</sup>.

In vorausgegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden mehrere potentielle Interaktionspartner von GRHL3 mittels Co-Immunpräzipitation und anschließender Massenspektrometrie identifiziert (Dissertation Kohlgrüber, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2016). Darunter befanden sich auch zwei Proteine, *Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein* (NONO) und *Splicing Factor, Proline- and Glutamine-Rich* (SFPQ), die aufgrund Ihrer Beteiligung an Transkriptions- und Spleißprozessen von besonderem Interesse sind. Diese Proteine können ein Heterodimer bilden und als solches Einfluss auf den Transkriptionsprozess nehmen, indem sie die Funktion der Topoisomerase I modulieren und das Entwinden der DNA-Doppelstränge unterstützen <sup>68</sup>. Allein oder im Komplex mit NONO ist SFPQ außerdem am prä-mRNA-Spleißen beteiligt, da es mit einem der Spleißosomenkomplexe assoziiert <sup>69-71</sup>. Als Spleißfaktor ist SFPQ unter anderem auch am alternativen Spleißen des CD45 Gens in humanen T-Zellen beteiligt <sup>72</sup>. Daher wäre auch vorstellbar, dass NONO und/oder SFPQ über eine Interaktion mit GRHL3 an dessen alternativen Spleißen beteiligt sind und diese damit in das Gleichgewicht seiner Isoformen, die positive bzw. negative Effekte auf Endothelzellfunktionen haben, eingreifen. Daher war ein Ziel der Arbeit, die Interaktionen zwischen GRHL3 und NONO sowie SFPQ mit unabhängigen biochemischen Methoden zu verifizieren.

Ein posttranslationaler Regulationsmechanismus, der im Kontext von endothelialer Funktion und Dysfunktion und den mit dieser Dysfunktion verbundenen kardiovaskulären Erkrankungen von Interesse ist, ist die Regulation der Transkriptionsfaktoraktivität über ihren Oxidationsstatus. Eines der Kennzeichen dieser Erkrankungen ist oxidativer Stress <sup>73</sup>, der im Endothel zum Abbau von Thioredoxin-1 und letztendlich Apoptose führt <sup>74, 75</sup>. Zudem wurde eine Herunterregulation von GRHL3 im Aortenendothel von Mäusen, welche eine fettreiche Ernährung (*Western diet*) erhalten hatten, die bekanntermaßen auch zu oxidativem

Stress führt <sup>76</sup>, beobachtet (Dissertation Kohlgrüber, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2016). Da zur Regulation von GRHL3, das wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität spielt, über seinen Oxidationsstatus nichts bekannt ist, sollte untersucht werden, ob Thioredoxin-1, welches eine zentrale Rolle in der Regulation von Transkriptionsfaktoren spielt, einen Einfluss auf die Transkriptionsfaktoraktivität von GRHL3 hat.

Weitere Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatten darauf hingedeutet, dass GRHL3 möglicherweise auch extranukleäre Funktionen hat (Dissertation Farrokh, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2015). Diese Untersuchungen waren *ex vivo* durchgeführt worden; *in vivo* konnte bisher nur gezeigt werden, dass GRHL3 im Endothel der Aorta von Mäusen vorhanden ist. Allerdings fehlen bisher Studien zur subzellulären Lokalisation von GRHL3 *in vivo*. Daher sollten im dritten Teil der Arbeit die Arbeiten zur extranukleären Funktion vertieft und vor allem Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation im Endothel *in vivo* durchgeführt werden.

Im Rahmen der beschriebenen Experimente wurde ausschließlich mit der Isoform 2 von humanem GRHL3, die das Homolog zu murinem GRHL3 darstellt, gearbeitet, um Vergleichbarkeit zwischen den Spezies zu gewährleisten. Der Einfachheit halber wird diese im Folgenden durchgängig als GRHL3 bezeichnet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit als dH<sub>2</sub>O bezeichnetem Reinstwasser angesetzt, welches mithilfe einer Filteranlage von Merck Millipore (Darmstadt) hergestellt wurde. Alle verwendeten Chemikalien waren p.a.- Qualität und wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Carl Roth (Karlsruhe) und Merck Millipore (Darmstadt) bezogen.

#### 2.1.2 Geräte

**Tabelle 2.1:** Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Feinwaage „CP124S“	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop „Axio Imager.M2“	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop „Axio Vert 200M“	Carl Zeiss, Jena
Heracell 240i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Inkubationsschüttler „Ecotron“	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
„iNTAS Gel iX Imager“	Royal Biotech, Frankfurt
Konfokal-Lasermikroskop „Andor Revolution WD spinning-disk confocal imaging 52 system” *	Andor Technology, Belfast, UK
Kühlzentrifuge „5810 R“	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge „Mikro 22 R“	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge „Rotina 420R“	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Lichtmikroskop „CKX31“	Olympus, Hamburg
Luminometer „Centro XS <sup>3</sup> LB 960“	Berthold Technologies
Magnetrührer	Yellow line
Orbitalschüttler	ELMI, Riga, Lettland
pH-Meter „SevenGo™“	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Photometer „SmartSpec™ Plus“	BioRad, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
PowerPac HC™	BioRad, München
Sicherheitswerkbank „HeraSafe“	Thermo Scientific
Thermal Cycler „MyCycler“	BioRad, München

Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge „Combi-Spin FVL-2400 N“	Peqlab, Erlangen
Überkopffrotator Rotator-Mixer „RM Multi-1“	StarLab, Hamburg
UV-Spektrophotometer “NanoDrop™ 2000c”	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Vakuumpumpe „Vacusafe“	IBS Integra Bioscience, Fernwald
Waage „440-43N“	Kern&Sohn GmbH, Baldingen-Frommern

*\*Andor Revolution WD (with Borealis) spinning-disk confocal imaging 52 system (Andor Technology, Belfast, UK) was comprised of an upright Nikon microscope with 53 a 60X water dipping objective (numerical aperture 1.0)*

### 2.1.3 Kommerziell erworbene Kits, Puffer und Reagenzien

**Tabelle 2.2:** Kommerziell erworbene Kits, Puffer und Reagenzien

<b>Kit, Puffer, Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
10x Trypsin-EDTA (0,5 g/l in PBS)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Bradfordreagenz „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate“	BioRad, München
DAPI	Roche, Mannheim
Dulbecco’s phosphate-buffered saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
“Duolink® In Situ Detection Reagents Red”	Sigma-Aldrich, München
“Duolink® In Situ PLA Probe Anti-Mouse PLUS”	Sigma-Aldrich, München
“Duolink® In Situ PLA Probe Anti-Rabbit MINUS”	Sigma-Aldrich, München
“Duolink® In Situ Wash Buffers, Fluorescence”	Sigma-Aldrich, München
„EGM™ SingleQuots®“	Lonza, Köln
Endothelial Basal Medium EBM	Lonza, Köln
„GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
“Gibson Assembly® Cloning Kit”	New England BioLabs, Frankfurt am Main
“HiSpeed® Plasmid Maxi Kit”	Qiagen, Hilden
„Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent“	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

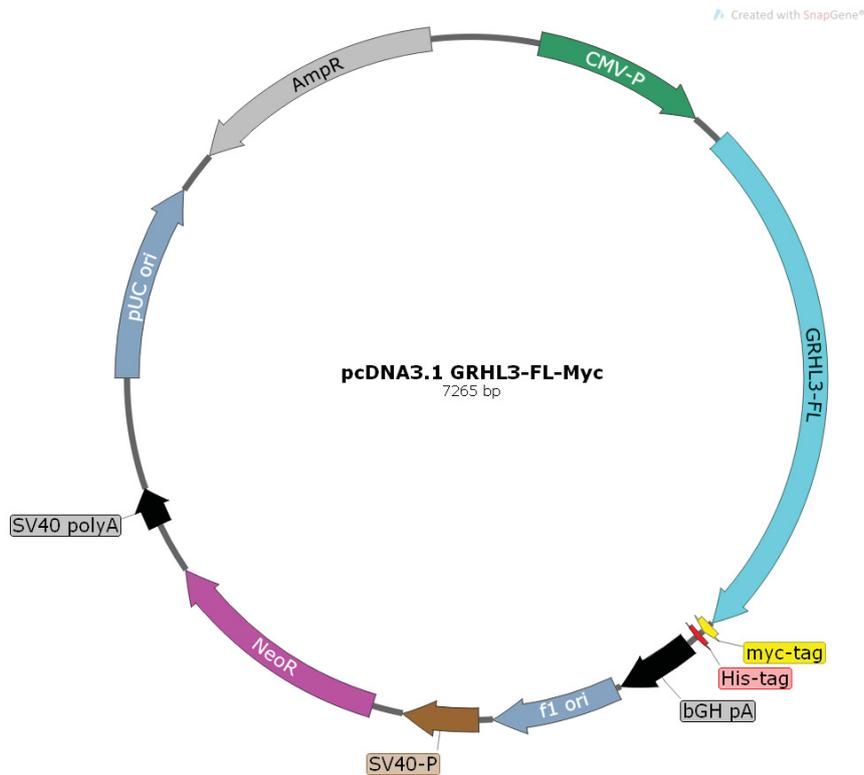
NEB Proteinstandard	New England BioLabs, Frankfurt am Main
“NEB® 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)”	New England Biolabs, Frankfurt am Main
“NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents”	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Normales Ziegenserum	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Pentobarbital Sodium CII	Diamondback Drugs, Scottsdale, AZ, USA
Phalloidin CF® 488	Biotium, Fremont, CA, USA
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail A	BioTool, München
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail B	BioTool, München
“Pierce™ ECL Western Blotting Substrate”	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
„ProLong™ Diamond Antifade Mountant“	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
Protease-Inhibitor-Cocktail	BioTool, München
Proteingrößenstandard “Precision Plus Protein™ Standard Kaleidoscope™“	BioRad, München
“QIAprep® Spin Miniprep Kit”	Qiagen, Hilden
“QIAquick® Gel Extraction Kit”	Qiagen, Hilden
<i>Reporter Lysis Buffer</i> (RLB)	Promega, Mannheim
Röntgen-Entwicklerkonzentrat	Adefo, Neu-Isenburg
Röntgen-Fixierkonzentrat	Adefo, Neu-Isenburg
„SOC Outgrowth Medium“	New England Biolabs, Frankfurt am Main
„SuperFect® Transfection Reagent“	Qiagen, Hilden

## 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.3:** Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Pipettenspitzen	StarLab, Hamburg
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyren Kulturröhrchen 17x95 mm	Simport Scientific, Saint-Mathieu-de-Beloeil, QC, Canada
Polyvinylidenfluorid (PVDF) –membran "Immobilon-P®" 0,45 µm Porengröße	Merck Millipore, Darmstadt
Reaktionsgefäße 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme „Fujifilm SuperRX“	A.Hartenstein, Würzburg
Serologische Pipetten 2 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
T-75-Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Tungstendraht (0,013 mm)	ElectronTubeStore.com, Cap-aux-Meules, QC, Canada
WB Apparaturen: Mini-Protean® Tetra System	BioRad, München
Whatman-Filterpapier	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Zellkulturplatten 6-well "CELLSTAR®"	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen 60 und 100 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellspachtel	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugationsröhrchen 15 ml, 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.5 Plasmide



**Abbildung 2.1: Plasmidkarte von pcDNA3.1 GRHL3-FL-Myc.** Schematische Darstellung des Expressionsplasmids von Komplet-GRHL3 (GRHL3-*full-length*, FL). Die codierende Sequenz verfügt über ein 3'-Myc-Epitop-*tag* (Myc-*tag*) sowie ein Histidin-*tag* (His-*tag*) und steht unter der Kontrolle eines CMV (Cytomegalovirus) -Promotors (CMV-P). An die codierende Sequenz schließt sich ein RNA-Prozessierungssignal (bGH pA) an. Zur Selektion in *E. coli* verfügt das Plasmid über eine Ampicillinresistenz (AmpR), zur Selektion in Säugerzellen über eine Neomycinresistenz (NeoR), welche unter der Kontrolle des *early* Promotors aus dem Affenvirus SV40 (SV40-P) steht und ein 3'-Polyadenylierungssignal besitzt (SV40 polyA). Des Weiteren befinden sich auf dem Plasmid zwei bakterielle Replikationsursprünge (f1 ori und pUC ori).

2.1.6 Oligonukleotide

**Tabelle 2.4:** Verwendete Primer für die Herstellung einer Deletionsmutante

Primer	Sequenz (5'-3')
hGRHL3 <i>BspE</i> I for	GATGACGAGCGGAAGCAGTT
hGRHL3 delta C5 for	GACGCCACCCCTGCTGTATGTGCGGAGGGA
hGRHL3 delta C5 rev	CATACAGCAGGGGTGGCGTCTCCAGGTCAG
Myc- <i>tag</i> rev2	TCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC

**Tabelle 2.5:** Verwendete Primer für die Plasmidsequenzierung

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
CMV-P for2	GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG

## 2.1.7 Verwendete Endonukleasen

**Tabelle 2.6:** Verwendete Endonukleasen (alle von New England Biolabs, Frankfurt am Main)

<b>Enzym</b>	<b>Schnittstelle/Sequenz (5'-3')</b>
<i>BspE</i> I	T/CCGGA
<i>Hinc</i> II	GTY/RAC
<i>Hind</i> III	A/AGCTT

## 2.1.8 Verwendete Antikörper

**Tabelle 2.7:** Verwendete Primärantikörper. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Primärantikörper für WB in 1 % MP, für IF in 1 % NZS verdünnt. WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz, MP = Magermilchpulver, NES = normales Eselserum, NZS = Normales Ziegenserum

Antikörper	Spezies	Verwendung	Verdünnung	Firma
Anti-Caspase 3	Kaninchen	WB	1:1.000 (zur Detektion der Pro-Caspase 3); 1:250 in 5 % MP (zur Detektion der Caspase 3 p17- und p12-Spaltprodukte)	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
Anti-eNOS	Kaninchen	IF	1:100	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-eNOS	Kaninchen	WB	1:500	Abcam, Cambridge, UK
Anti-eNOS (Klon 3)	Maus	<i>En face</i>	1:100 in 0,2 % Triton X-100 und 5 % NES	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-GAPDH	Maus	WB	1:50.000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-GRHL3	Kaninchen	WB, IF, <i>en face</i>	1:1.000 (WB) 1:250 (IF) 1:1.000 in Triton X-100/PBS/ NES ( <i>en face</i> )	Merck Millipore, Darmstadt
Anti-Myc (Klon 9B11)	Maus	WB, IF	1:500 (WB) 1:100 (IF)	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
Anti-NONO/nmt55	Maus	WB	1:1.000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-SFPQ	Maus	WB	1:2.000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Topoisomerase I	Kaninchen	WB	1:200 in 1 % MP + 2 % NZS	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti- $\alpha$ -Tubulin	Maus	WB	1:10.000	Sigma-Aldrich, München

**Tabelle 2.8:** Verwendete Sekundärantikörper. WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
AlexaFluor® goat anti-rabbit 594	Ziege	IF	1:500 in PBS	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
Alexa-Fluor® goat anti-rabbit 568	Ziege	<i>En face</i>	1:500 in PBS	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
Anti-Rabbit IgG (HRP- gekoppelt)	Esel	WB	1:5.000 in 1 % MP	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Anti-Mouse IgG (HRP- gekoppelt)	Schaf	WB	1:5.000 in 1 % MP	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Verwendeter Bakterienstamm

Für alle Klonierungen und Plasmidisolierungen wurde der chemisch kompetente *Escherichia coli* Stamm NEB 5-alpha (New England Biolabs, Frankfurt) mit Genotyp *fhuA2 D(argF-lacZ) U169 phoA glnV44 f80D(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* verwendet.

#### 2.2.1.2 Transformation in *Escherichia coli*

Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl chemisch kompetenter NEB 5-alpha Bakterien in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß auf Eis aufgetaut und 10 ng ungeschnittene Plasmid-DNA bzw. 2 µl des *Gibson Assembly*-Klonierungsmixes (Abschnitt 2.2.2.6) hinzugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für exakt 30 Sekunden; anschließend wurden die Bakterien wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden 950 µl SOC-Medium ohne Antibiotikum zu jeder Probe gegeben und die Ansätze für 1 Stunde bei 37 °C und 200 Upm im Inkubationsschüttler inkubiert. Diese Kulturen wurden anschließend für 5 Minuten bei 3200 xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Unter semi-sterilen Bedingungen wurden dann 10 µl der Suspension auf eine vorgewärmte LB-Agar-Platte mit Ampicillin und die restlichen 90 µl auf eine zweite Platte mit einem Drigalskispatel ausplattiert und die Platten kopfüber über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 2.9:** Selbst hergestellte Puffer und Lösungen für mikrobiologische Methoden

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung	
LB-Agarplatten	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	15 g/l	Agar
		Autoklavieren, abkühlen lassen, bei Bedarf Antibiotikum mit Endkonzentration 100 µg/ml zugeben, in 10-cm-Petrischalen gießen und kopfüber bei 4 °C lagern
LB-Medium	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
		Autoklavieren, abkühlen lassen, bei Bedarf Antibiotikum mit Endkonzentration 100 µg/ml zugeben

### 2.2.1.3 Ansetzen von Bakterienkulturen

Um die auf den LB-Agar-Platten gewachsenen Bakterien zu kultivieren, wurden einzelne Kolonien mithilfe einer Pipettenspitze gepickt und in separate 10 ml Zentrifugationsröhrchen mit 2,5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Die Flüssigkulturen wurden als Vorbereitung für eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab für 18 Stunden und 200 Upm bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert; sollten sie für eine Plasmidisolierung im großen Maßstab verwendet werden, wurde die Flüssigkultur für 5 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Nach Ablauf der 5 Stunden wurden 200 µl der Vorkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium mit 100 µg/µl Ampicillin gegeben. Von jedem Plasmid wurden dabei zwei Ansätze gemacht und über Nacht (18 Stunden) bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Beide Übernachtskulturen wurden am nächsten Tag zur Plasmidisolierung (Abschnitt 2.2.1.7) verwendet.

### 2.2.1.4 Präparative Polymerase-Kettenreaktion

Als Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wird eine Methode bezeichnet, bei der eine definierte DNA-Sequenz mithilfe kurzer, spezifischer Oligonukleotide (Primer) von einer Ausgangs-DNA amplifiziert werden kann <sup>77</sup>. Im

Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR nur zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen genutzt und, um Fehlinkorporationen zu minimieren, „Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase“, die eine *proofreading*-Aktivität besitzt, nach Herstellerangaben eingesetzt. Als *template* für die Amplifikationen wurden jeweils 10 ng Plasmid DNA eingesetzt, die Anzahl der Zyklen während Amplifikation (Denaturierung, *Annealing*, *Elongation*) variierte je nach Menge der Ausgangs-DNA. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, hier wurde als Richtwert 1 Minute pro 1.000 bp angesetzt.

**Tabelle 2.10:** Reaktionsansatz für die präparative Polymerase-Kettenreaktion

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration
Q5 Reaktionspuffer (5x)	10	1x
Q5 <i>high GC enhancer</i>	10	
DNA-Template	x	1 ng/µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	2,5	0,5 µM
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	2,5	0,5 µM
dNTPs (10 mM)	1	200 µM
Q5 <i>High Fidelity</i> DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,5	0,02 U/µl
dH <sub>2</sub> O	ad 50	

**Tabelle 2.11:** Programm für die Polymerase-Kettenreaktion

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Anzahl Zyklen
<i>Hot Start</i>	94	5:00	x 1
Denaturierung	94	0:30	
<i>Annealing</i>	60	0:30	x 45 bzw. abhängig von
<i>Elongation</i>	72	0:30	Menge der Ausgangs-DNA
<i>Final</i>			
<i>Elongation</i>	72	5:00	x 1
Lagerung	4	∞	x 1

### 2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können ihrer Größe nach elektrophoretisch in einer Agarosegelmatrix aufgetrennt werden. Dabei müssen je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente unterschiedliche Prozentigkeiten an Agarose genutzt werden.

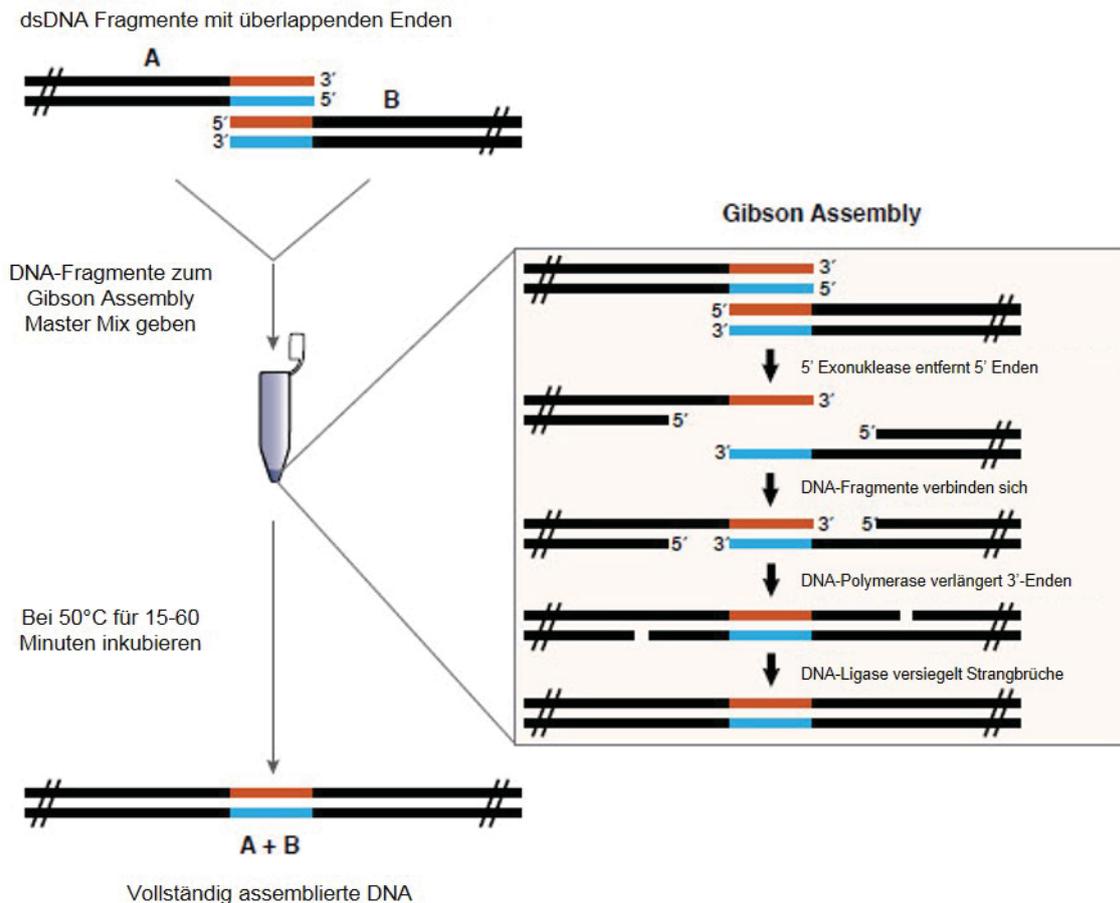
Der prozentuale Anteil (w/v) Agarose wurde abgewogen und in 1x TAE-Puffer zum Lösen in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf etwa 50-60 °C wurde der Agarose Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugefügt. Die noch flüssige Agarose wurde in einen Gelschlitten gegossen und der gewünschte Kamm eingesteckt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine Flachbettapparatur eingesetzt und mit 1x TAE-Puffer übergossen. Die durch den Kamm entstandenen Taschen wurden dann mit den Proben beladen, die zuvor mit 1/5 Volumen 6x DNA-Probenpuffers versetzt wurden; als Referenz wurde zudem ein Größenstandard mit DNA-Banden bekannter Größen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4-8 V/cm für 45-60 Minuten. Im Anschluss an die Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente im Gel mit dem Geldokumentationssystem „INTAS Gel iX Imager“ detektiert.

**Tabelle 2.12:** Verwendete Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung	
Tris-Acetat EDTA Puffer (TAE)	40 mM	Tris-Base
	0,1 % (v/v)	Essigsäure
	1 mM	EDTA
6x DNA-Probenpuffer	30 % (v/v)	Glycerin
	60 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	60 mM	EDTA
	0,05 % (w/v)	Orange G
	0,05 % (w/v)	Xylencyanol

### 2.2.1.6 Gibson Assembly-Klonierung

Mit der *Gibson Assembly*-Klonierung können mehrere DNA-Fragmente, die überlappende Sequenzabschnitte von 18-23 bp besitzen, in einer Multienzym-Reaktion miteinander verbunden werden (Abbildung 2.2). Dabei entfernt eine Exonuklease zunächst am 5'-Ende der Doppelstrang-DNA einige Nukleotide, sodass 3'-Überhänge entstehen, die zueinander komplementär sind. Im nächsten Schritt lagern sich diese komplementären Überhänge aneinander an und werden durch eine Polymerase aufgefüllt. Eine Ligase verknüpft schließlich die DNA-Stränge durch Bildung kovalenter Esterbindungen in 5'-3'-Richtung.



**Abbildung 2.2 Übersicht über die Gibson-Assembly-Reaktion.** Modifiziert nach [https://www.neb.com/products/e2611-gibson-assembly-master-mix#Product%20Information\\_Properties%20%20Usage](https://www.neb.com/products/e2611-gibson-assembly-master-mix#Product%20Information_Properties%20%20Usage)

Zur Durchführung dieser Methode wurde das „Gibson Assembly® Cloning Kit“ nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde abhängig von der Größe der Bakterienkultur (Abschnitt 2.2.1.3) das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (2,5-ml-Kultur) oder das „QIAfilter Plasmid Maxi Kit“ (2x100-ml-Kultur) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben mit folgenden Modifikationen:

„Miniprep Kit“:

- Die Lyse nach Zugabe von Puffer P2 erfolgte für 4:30 Minuten
- Nach der Bindung der DNA auf die Säule wurde diese zweimal mit jeweils 600 µl PE-Puffer gewaschen
- Zur vollständigen Trocknung der Säule wurde diese 2 Minuten zentrifugiert

„Maxi Kit“:

- Zur Lyse und Neutralisierung der Bakterien einer 100-ml-Kultur wurden jeweils 8 ml Puffer P1, P2 und P3 eingesetzt
- Die Bakterien wurden für 4:30 Minuten in P2 lysiert
- Nach Zugabe von P3 wurde das Lysat für 15 Minuten bei 3200 xg zentrifugiert
- Die zentrifugierten, gefilterten Lysate von je zwei 100 ml Kulturen wurden vor dem Aufbringen auf die 60-ml-Filtersäule vereinigt
- Das Waschen des Präzipitators erfolgte mit 2,5 ml 70 % Ethanol
- Die DNA wurde in zwei Schritten mit insgesamt 800 µl TE-Puffer, der auf 65 °C vorgewärmt war, eluiert; die erste Elution erfolgte mit 500 µl TE-Puffer, danach wurde eine zweite Elution mit weiteren 300 µl TE-Puffer durchgeführt

Im Anschluss an die Isolierung wurde die DNA-Konzentration der Eluate mit einem UV-Spektrophotometer („NanoDrop™ 2000c“) gemessen. Die Eluate wurden nur vereinigt, wenn damit eine Konzentration von mindestens 0,5 µg/µl erreicht werden konnte; in diesem Fall wurde die DNA-Konzentration nach Vereinigung nochmals bestimmt. In allen anderen Fällen wurde nur das Eluat mit dieser Mindestkonzentration genutzt.

#### 2.2.1.8 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden genutzt, um die Identität von neu klonierten oder für weitere Versuche isolierten Plasmiden zu verifizieren und um DNA-Fragmente für Klonierungen herzustellen. Dafür wurden 5-10 µg Plasmid-DNA mit den entsprechenden Endonukleasen (Tabelle 2.6) und dem zugehörigen Pufferkonzentrat nach Herstellerangaben gemischt und für 3-4 Stunden oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Richtlinie wurde pro µg Plasmid 1 U Enzym eingesetzt.

#### 2.2.1.9 DNA-Elution aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „QIAquick® Gel Extraction Kit“ nach Herstellerangaben verwendet.

#### 2.2.1.10 Plasmidsequenzierung

Um die Identität neu klonierter Plasmide auf DNA-Sequenzebene zu verifizieren, wurden die Bereiche der Plasmide, die mittels einer PCR erzeugt worden waren, sequenziert. Das Sequenzieren wurde extern von der Firma StarSEQ GmbH (Mainz) durchgeführt. Entsprechend der Vorgaben („U-Mix Protokoll“) wurden pro Probe 500 ng Plasmid-DNA und 10 pmol/µl jeweils benötigten Primers (Tabelle 2.5) eingesetzt und in einem 0,2-ml-Reaktionsgefäß mit dH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 7 µl aufgefüllt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden in Form einer Textdatei sowie

eines Chromatogramms erhalten und konnten dann mithilfe des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)-Algorithmus mit der erwarteten Sequenz verglichen werden.

## 2.2.2 Zell- und proteinbiochemische Methoden

Alle zellbiologischen Experimente wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in T-75-Zellkulturflaschen kultiviert und bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 % v/v) aufbewahrt.

### 2.2.2.1 Kultivierung humaner primärer Nabelschnur-Endothelzellen

Bei diesen Zellen handelt es sich um aus der Nabelschnurvene gewonnene humane Endothelzellen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC), die von der Firma Lonza bezogen wurden. Die Zellen wurden in *Endothelial Basal Medium* (EBM) Komplettmedium kultiviert, dem 10 % (v/v) fötales Kalbserum (*Fetal Calf Serum*, FCS) sowie die „EGM™ SingleQuotes®“ (1 µg/ml Hydrocortison, 12 µg/ml Rinderhirnextrakt, 50 µg/ml Gentamicin, 50 ng/ml Amphotericin B und 10 ng/ml *epidermal growth factor*) als Zusätze zugegeben wurden. Die Zellen wurden in Passage 3 für Experimente genutzt. Um die Zellen für Experimente auszubringen, wurden sie zunächst in ca. 6 ml PBS gewaschen und mit 2 ml einer 1x Trypsin-EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst. Dabei wurde die Reaktion unter einem Durchlichtmikroskop beobachtet und die Reaktion mit 8 ml EBM-Komplettmedium abgestoppt, sobald sich etwa 90 % der Zellen abgerundet hatten. Im Anschluss wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber im Medium vom Boden abgelöst, resuspendiert und zur Bestimmung der Zellzahl in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt (Abschnitt 2.2.2.3).

### 2.2.2.2 Kultivierung humaner embryonalen Nierenzellen

Die Kultivierung der humanen embryonalen Nierenzelllinie (*Human Embryonic Kidney Cells*, HEK293T) erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) Glutamax, welchem 10 % (v/v) FCS (für 1 Stunde bei 56 C hitzeinaktiviert) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) hinzugefügt wurde. Bei einer Konfluenz von ca. 85 % wurden die Zellen in neue T-75-Zellkulturflaschen passagiert oder zu experimentellen Zwecken in Zellkulturschalen ausgesät. Dafür wurden die Zellen zunächst vorsichtig mit etwa 6 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml einer 1x Trypsin-EDTA-Lösung unter Rütteln vom Flaschenboden abgelöst. Um die Trypsinreaktion abzustoppen, wurden 8 ml DMEM Komplettmedium auf die Zellen gegeben, die Zellen resuspendiert, ein Aliquot (ca. 200 µl) 1:3 mit PBS verdünnt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt (Abschnitt 2.2.2.3).

### 2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden 10 µl einer Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und die vier großen Quadrate an einem Durchlichtmikroskop ausgezählt. Mithilfe der nachfolgenden Formel ergab sich bei einem definierten Volumen von 10<sup>-4</sup> ml die Zellkonzentration:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{Summe der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} * \text{Verdünnung} * 10^4$$

### 2.2.2.4. Transiente Transfektion von humanen primären Nabelschnur-Endothelzellen mit SuperFect®

Für die transiente Transfektion mit „SuperFect® Transfection Reagent“ wurden primäre Nabelschnur-Endothelzellen in einer Anzahl von 2x10<sup>5</sup> (6-cm-Zellkulturschale) bzw. 7x10<sup>4</sup> (6-well-Platte; auf Glasplättchen) ausgebracht und für 24 Stunden in EBM-Komplettmedium kultiviert. Am nächsten Tag wurden je nach Schalengröße pro Transfektionsansatz 1,2 µg (6-well-Platte) oder 3 µg Plasmid-DNA (6-cm-Zellkulturschale) mit 125 µl bzw. 150 µl EBM ohne Zusätze (0 %-EBM) sowie 12 µl bzw. 20 µl „SuperFect® Transfection Reagent“ vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen zweimal mit 0 %-EBM gewaschen. Die Inkubation der Transfektionsansätze wurde durch Zugabe von 0,625 ml bzw. 1 ml Komplett-EBM abgestoppt und gut gemischt. Pro Ansatz wurden dann entsprechend der Schalengröße 0,75 ml bzw. 1,1 ml des Transfektionsgemischs verwendet und die Schalen in den Inkubator zurückgestellt.

Drei Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt, durch EBM-Komplettmedium ersetzt und nach zwei weiteren Stunden ggf. eine Behandlung durchgeführt. 18 Stunden nach der letzten Behandlung konnten die Zellen schließlich je nach weiterer Verwendung geerntet (Abschnitt 2.2.2.6) oder fixiert (Abschnitt 2.2.2.13) werden.

### 2.2.2.5 Transiente Transfektion der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T mit Lipofectamine®

Um HEK293T Zellen transient zu transfizieren, wurde das Transfektionsreagenz „Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent“ verwendet. 24 Stunden vor der geplanten Transfektion wurden 3x10<sup>6</sup> Zellen auf eine 10-cm-Zellkulturschale ausgebracht und in DMEM-Komplettmedium kultiviert. 2 Stunden vor der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch frisches DMEM ohne Pen/Strep ersetzt. Pro Transfektionsansatz wurden insgesamt 20 µg DNA eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde zusammen mit 40 µl „Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent“

(Verhältnis 1:2) in 1,25 ml DMEM ohne Pen/Strep vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem DMEM-Komplettmedium verwendet wurde. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen schließlich geerntet (Abschnitt 2.2.2.6).

#### 2.2.2.6 Zellernte und -lyse

Für die Ernte wurden die Zellen in ihren Schalen auf Eis gestellt, mit einem Zellschaber vom Schalenboden abgelöst und in ein vorgekühltes 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eiskaltes PBS auf die Schalen gegeben, die restlichen Zellen abgelöst und dem 50-ml-Reaktionsgefäß zugeführt. Die so gesammelten Zellen wurden dann in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge für 10 Minuten bei 800 xg (HUVEC) bzw. 1500 xg (HEK293T) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in eiskaltem PBS resuspendiert, in ein vorgekühltes 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 800 xg bzw. 1500 xg für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. In einem letzten Schritt wurde der Überstand verworfen, das Pellet erneut in eiskaltem PBS gewaschen und ein weiteres Mal unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Zellpellet entweder direkt lysiert (siehe unten) oder bei -80 °C eingefroren.

In der Regel wurden alle Zellen für die Proteinanalyse in Lysepuffer A lysiert (Tabelle 2.13). Als einzige Ausnahme wurde für den Nachweis der Transkriptionsaktivität (Luziferase-Reportergen-Assay, Abschnitt 2.2.2.9) der kommerziell erworbene *Reporter Lysis Buffer* (RLB) eingesetzt.

**Tabelle 2.13:** Verwendete Puffer für die Zelllyse

Lysepuffer	Zusammensetzung/Hinweise	
<b>Lysepuffer A</b>	20 mM	TrisCl pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	1 % (v/v)	Triton X-100
<b>5x RLB (<i>Reporter Lysis Buffer</i>)</b>	proprietär	

Bei der Verwendung von Lysepuffer A wurden die Zellpellets abhängig von ihrer Größe und dem Versuch in der zwei- bis dreifachen Menge Lysepuffer unter Zugabe von Protease- und ggf. Phosphataseinhibitoren (Verdünnung 1:100) resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 15 Minuten bei 14.000 xg und 4 °C

zentrifugiert und der Überstand in ein neues, gekühltes 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Wurde der 5x RLB verwendet, wurde dieser zunächst 1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt, ebenfalls Proteaseinhibitor hinzugefügt und die Zellpellets abhängig von ihrer Größe in einem bestimmten Volumen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde sofort in Flüssigstickstoff schockgefrostet und anschließend nach vollständigem Auftauen bei Raumtemperatur für etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden die Zellen 15 Minuten bei 14.000 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues, gekühltes 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Im Anschluss an beide Lyseverfahren wurde der Proteingehalt nach Bradford ermittelt (Abschnitt 2.2.2.8).

#### 2.2.2.7 Fraktionierung von Zellkern und Zytoplasma

Für die Fraktionierung der Zellen in eine Zellkern- und eine Zytoplasmafraktion wurde das „NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit“ verwendet. Die Zellpellets wurden in CER I plus Proteaseinhibitor (CER I+) resuspendiert und auf höchster Stufe 15 Sekunden lang auf dem Vortexer gerüttelt. Nach anschließender 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden 5,5 µl CER II zu jeder Probe hinzugegeben, 5 Sekunden lang auf dem Vortexer gerüttelt und 1 Minute auf Eis gestellt. Nach neuerlichen 5 Sekunden auf dem Vortexer wurden die Zellen für 5 Minuten bei 16.000 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß transferiert. Diese wurden erneut für 15 Minuten bei 16.000 xg und 4°C zentrifugiert, um potentielle nukleäre Verunreinigungen zu entfernen. Der so gesäuberte Überstand, welcher die zytoplasmatische Fraktion enthält, wurde abgenommen und in einem neuen 1,5-ml-Reaktionsgefäß kaltgestellt. Die zurückgebliebenen Zellkernpellets wurden 5x in 1 ml kaltem PBS gewaschen und jeweils für 3-5 Minuten bei 3.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde jedes Pellet in 300 µl CER I+ aufgenommen und erneut für 10 Minuten bei 16.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Die so gewaschenen Kernpellets wurden in je 20 µl NER plus Proteaseinhibitor (NER+) aufgenommen und 15 Sekunden lang gründlich auf dem Vortexer gerüttelt, für wenige Sekunden bei 4 °C und 3.000 xg zentrifugiert und für insgesamt 60 Minuten auf Eis inkubiert und dabei alle 10 Minuten erneut durch Vortexen für jeweils 15 Sekunden gemischt. Danach wurden die Pellets für 10 Minuten bei 16.000 xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand, welcher die nukleäre Fraktion enthält, in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Von beiden Fraktionen wurde der Proteingehalt nach der Bradford-Methode bestimmt (Abschnitt 2.2.2.8).

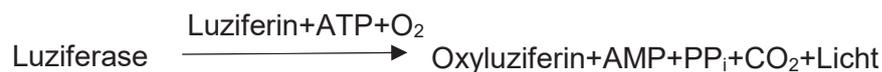
#### 2.2.2.8 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde 1 µl Lysat mit 799 µl dH<sub>2</sub>O und 200 µl Bradfordreagenz in einer Plastikkuvette gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei

Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm in einem Photometer gemessen. Zur Bestimmung des apparativ bedingten Hintergrundsignals wurde 1 µl des entsprechenden Lysepuffers eingesetzt und alle Messwerte für diesen *blank*-Wert korrigiert. Mithilfe einer zuvor erstellten Kalibrierungsgeraden unterschiedlicher, bekannter BSA-Konzentrationen konnte dann der Proteingehalt berechnet werden.

### 2.2.2.9 Luziferase-Reporter-Gen-Assay

Für diesen Versuch macht man sich die aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* isolierte Luziferase zunutze. Diese katalysiert unter Verbrauch von ATP die Umsetzung von D-Luziferin zu Oxyluziferin, wobei sicht- und messbares Licht emittiert wird. Dabei ist die emittierte Lichtmenge (*RLU – Relative Light Units*) bei nicht limitierenden Konzentrationen von ATP direkt proportional zur Luziferasemenge und kann damit als quantitatives Maß eingesetzt werden. Hierbei war es wichtig, entweder identische Proteinmengen oder Volumina der Lysate einzusetzen. In der anschließenden Auswertung wurden die Ergebnisse in RLU/µg Protein angegeben.



Für die Messungen wurden nach Bestimmung der Proteinmenge 10 µg Protein eingesetzt. Die Lysate wurden mit 1x RLB auf 20 µl aufgefüllt und in eine weiße, lichtdichte 96-well Platte pipettiert. Als *blank* wurden 20 µl 1x RLB eingesetzt. Zur Messung wurden 100 µl des Luziferase-Substratmixes in einem Luminometer mit automatischem Injektionssystem injiziert und die Lichtemission nach einer Verzögerung von 120 Sekunden für 5 Sekunden gemessen.

**Tabelle 2.14:** Verwendete Puffer und Lösungen für die Luziferasereaktion

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung	
	20 mM	Tricine KOH, pH 7,8
	0,1 mM	EDTA
	8 mM	MgCl <sub>2</sub>
Luziferase-Substratmix	33,3 mM	DTT
	270 mM	Coenzym A
	530 mM	ATP
	470 mM	D-Luziferin

### 2.2.2.10 Immunpräzipitation von HUVEC-Lysaten

Um ausreichend Protein für eine Immunpräzipitation (IP) zu erhalten, wurden 20 T-75-Zellkulturflaschen mit je  $1,4 \times 10^6$  HUVEC ausgebracht; je 10 Flaschen für die unbehandelte Kontrolle und 10 für die Behandlung mit Natrium-Nitroprussid (*Sodium Nitroprusside*, SNP, ein NO-Donor). Etwa 24 Stunden später wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.6 geerntet und pelletiert. Die Zellpellets wurden in Abhängigkeit ihrer Größe in einer bestimmten Menge Lysepuffer A plus Proteaseinhibitor (Abschnitt 2.2.2.6) lysiert und der Proteingehalt bestimmt (Abschnitt 2.2.2.8). Für jede IP wurden 500 µg Protein eingesetzt, welches mit dem Lysepuffer in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß auf ein Gesamtvolumen von 500 µl eingestellt wurde und somit einer Konzentration von 1 µg/µl entsprach. Für die spätere Kontrolle wurden von beiden Proben 50 µg des Lysats mit  $\frac{1}{4}$  Volumen 5x SDS-Probenpuffer versetzt und bei -20 °C eingefroren.

Bei der Immunpräzipitation wurden Protein A- bzw. Protein G-gekoppelte Sepharosekügelchen (Sepharose A bzw. Sepharose G) verwendet, die zunächst von Ethanol gesäubert und umgepuffert werden mussten. Dazu wurde die benötigte Menge Sepharose in PBS aufgenommen, bei 3200 xg und 4 °C für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dreimaliger Wiederholung wurde das gereinigte Pellet im Volumenverhältnis 1:1 in PBS aufgenommen; die so gereinigten Sepharosekügelchen konnten nun verwendet werden.

Die Proben wurden zunächst einem *Pre-Clean* unterzogen, bei dem unspezifische Bindungspartner entfernt wurden. Dafür wurden für jede Probe je 15 µl Sepharose A und G eingesetzt und für 1 Stunde bei 4 °C auf einem Überkoprotator inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 3200 xg und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß übertragen und die Sepharose verworfen.

Um das Zielprotein zu binden, wurde dem Überstand der entsprechende Primärantikörper mit einer Konzentration von 10 µg/ml hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C auf dem Überkoprotator inkubiert. Wurde GRHL3 als Primärantikörper verwendet, so wurde an dieser Stelle das dazugehörige Prä-Immunisierungsserum als Negativkontrolle eingesetzt. Dieses wurde im Vorfeld 1:50 mit Lysepuffer verdünnt und nach der Proteinbestimmung für jeweils eine Kontrolle pro Probe anstelle des GRHL3-Antikörpers in der Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Bei anderen Primärantikörpern wurde ein Antikörper gleichen IgG-Isotyps als Negativkontrolle gewählt, von dem bekannt ist, dass er nicht das Zielprotein bindet (z.B. anti-Flag-tag als Negativkontrolle zu anti-eNOS).

Am nächsten Tag wurden den Proben je 40 µl/mg Protein Sepharose A und G hinzugefügt und für weitere 2 Stunden bei 4 °C auf dem Überkoprotator invertiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 3.200 xg und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Die pelletierte Sepharose wurde 4x mit jeweils 500 µl Lysepuffer plus Proteaseinhibitor gewaschen und jeweils für 1 Minute bei 5.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Am Ende des vierten Waschgangs wurde der Überstand verworfen, das Sepharosepellet

trockengelegt und 1:1 in 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Pellets wurden dann bei 95 °C für 10 Minuten inkubiert und im Anschluss bei -20 °C eingefroren.

#### 2.2.2.11 Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen aus komplexen Proteingemischen, wie z.B. Zelllysaten, nach ihrem Molekulargewicht, wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamidmatrix eingesetzt. Die Proteine wurden in dieser unter denaturierenden Bedingungen geelektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund der Diskontinuität des Gels werden die Proteine zunächst an der Grenze von Sammel- und Trenngel fokussiert, bevor sie im Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden. Abhängig von der molekularen Größe des zu untersuchenden Proteins wurden Gele mit unterschiedlichen Konzentrationen an Polyacrylamid/Bisacrylamid eingesetzt, da diese Konzentration bestimmend für die Porengröße der Gelmatrix ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10 %- und 14 %-ige Gele verwendet. Da es sich bei dem Polyacrylamidgel um ein diskontinuierliches Gel handelt, wurde es in zwei Schritten hergestellt. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen und somit eine gerade Kante herzustellen. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol restlos entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Im noch flüssigen Zustand wurde dann ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt und das fertig polymerisierte Gel in die Vertikalapparatur eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit ¼ Volumen 5x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt, wodurch die Proteine denaturieren und durch DTT reduziert werden. Das SDS sorgt dafür, dass die Proteine eine negative Ladung erhalten, wodurch die Auftrennung in einem elektrischen Feld ermöglicht wird. Die Proben sowie ein entsprechender Proteinstandard zum Größenvergleich wurden dann in die Geltaschen aufgetragen und eine konstante Feldstärke (11-15 V/cm) angelegt.

**Tabelle 2.15:** Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE. Alle Angaben sind in ml.

Komponente		10 % Trenngel (ml)	14 % Trenngel (ml)	5 % Sammelgel (ml)
1M	Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	0,63
1,5 M	Tris-HCl (pH 8,8)	3,9	3,9	-
30 % (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	5,0	7,0	0,83
10 % (v/v)	SDS	0,15	0,15	0,05
10 % (w/v)	APS	0,15	0,15	0,05
	TEMED	0,009	0,006	0,005
	dH <sub>2</sub> O	6,1	4,1	3,4

**Tabelle 2.16:** Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

<b>Puffer, Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>		
5x SDS-Probenpuffer	312,5	mM	TrisCl pH 6,8
	10	% (w/v)	SDS
	50	% (v/v)	Glyzerin
	250	mM	DTT
	0,05	%	Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	25	mM	Tris
	0,1	% (w/v)	SDS
	192	mM	Glycin

### 2.2.2.12 Proteindetektion mittels Western Blot

Um die aufgetrennten Proteine nun mithilfe von Antikörpern nachweisen zu können, mussten sie elektrophoretisch auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) übertragen werden. Vor Verwendung musste die PVDF-Membran für eine Minute in Methanol aktiviert, kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in Transferpuffer äquilibriert werden. Unter ständiger Befeuchtung mit Transferpuffer wurde schließlich die Transferkammer zusammengebaut: Auf der der Kathode zugewandten Seite der Kassette wurde zunächst ein Schwamm gelegt, darauf ein Stück Whatmanpapier, dann vorsichtig das Gel. Auf dieses wurde die aktivierte PVDF-Membran gelegt und vorsichtig sämtliche Luftblasen entfernt. Schließlich wurde wieder ein Stück Whatmanpapier sowie ein weiterer Schwamm auf die Kassette gelegt und diese geschlossen. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wurden die Proteine unter Beibehaltung ihrer Auftrennung vom Gel auf die Membran transferiert. Wegen der hohen Hitzeentwicklung ist es nötig, diesen Transfervorgang unter Verwendung eines Kühlakkus oder ähnlichem bei 4 °C durchzuführen. Generell wurde bei kleinen Proteinen (<100 kDa, 14 %-iges Gel) der Transferpuffer ohne SDS verwendet; der Transfer erfolgte je nach Versuch für 1-3 Stunden bei 100 V. Wurden große Proteine (>100 kDa, 10 %-iges Gel) nachgewiesen, wurde der Transferpuffer mit SDS verwendet und 2-3 Stunden bei 80 V transferiert.

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers an die Membran zu verringern, wurde diese nach dem Transfer kurz in TBS-T gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Blockierungslösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T) auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Somit wurden sämtliche Stellen der Membran, an die kein Protein transferiert wurde, mit Milchprotein geblockt. Diese Blockierungslösung wurde für die Antikörperverdünnung mit TBS-T auf 1 % verdünnt. Die Membran wurde nach Bedarf zurechtgeschnitten und über Nacht im jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 2.7) bei 4 °C inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran 3x10 Minuten in TBS-T auf dem Orbitalschüttler gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit

dem an eine Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase*, HRP) gekoppelten Sekundärantikörper, der entsprechend der Spezies, aus der der Primärantikörper stammt, gewählt wurde. Der Sekundärantikörper wurde 1:5.000 in 1 % Magermilchpulver verdünnt, auf die Membran gegeben und diese 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler inkubiert (Tabelle 2.8). Nach der Inkubation wurde die Membran wieder 3x10 Minuten auf dem Orbitalschüttler gewaschen.

Um die spezifische Bindung des Antikörpers an das Protein auf der Membran nachzuweisen, wurde ein Chemilumineszenz-Substrat (*Enhanced Chemiluminescence*, ECL) eingesetzt, welches von der an den Sekundärantikörper gekoppelten HRP umgesetzt wird. Das dabei entstehende Licht wurde in einer Dunkelkammer in einer Autoradiographie-Kassette auf Röntgenfilm aufgenommen. Abhängig von Proteinmenge und Sensitivität des Antikörpers wurden Röntgenfilme unterschiedlich lange belichtet und anschließend per Hand in Entwicklungs- und Fixierungslösung behandelt. Die semiquantitative Auswertung wurde mit der ImageJ 1.45s Software durchgeführt.

**Tabelle 2.17:** Verwendete Puffer und Lösungen für den Western Blot

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung		
Transferpuffer mit SDS	48	mM	Tris
	386	mM	Glycin
	0,05	% (w/v)	SDS
	20	% (v/v)	Methanol
Transferpuffer ohne SDS	24	mM	Tris
	193	mM	Glycin
	20	% (v/v)	Methanol
Tris-buffered saline + Tween-20 (TBS-T)	50	mM	Tris (pH 7,0)
	150	mM	NaCl
	5	mM	KCl
	0,01	% (v/v)	Tween-20
Blockierungslösung	5	% (w/v)	Milchpulver in TBS-T

### 2.2.2.13 Immunfluoreszenz

Zur Detektion von Proteinen in der Zelle wurden  $7 \times 10^4$  HUVEC auf 2x2 cm große, vorbehandelte Deckgläschen in 6-well Platten ausgebracht. Die Deckgläschen wurden im Vorfeld für mindestens 3 Stunden in 7 %-iger Essigsäure inkubiert und anschließend mehrfach mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Mit 100 %-igem Ethanol überschichtet wurden sie über Nacht unter dem Abzug getrocknet und am nächsten Tag in Alufolie autoklaviert. Am Tag nach dem Ausbringen wurden die Zellen mit der gewünschten Plasmid-DNA transfiziert. Drei Stunden nach der Transfektion wurde das Medium

gewechselt und die Zellen ggf. nach zwei weiteren Stunden mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  oder 10  $\mu\text{M}$  SNP behandelt. 18 Stunden nach der Behandlung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 15 Minuten in 4 % (w/v) PFA in PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Proben in einem Puffer mit 3 % normalem Ziegerserum (NZS), 0,3 % Triton X-100 in PBS und 100 mM Glycin für 15 Minuten bei Raumtemperatur gleichzeitig permeabilisiert und geblockt. Im Anschluss wurden die Zellen 3x5 Minuten in PBS gewaschen und die Verdünnungen für die Primärantikörper vorbereitet. Dafür wurden die jeweiligen Antikörper in 1 % NZS in PBS verdünnt und jedes Deckglas in 100  $\mu\text{l}$  Lösung inkubiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst 3x5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur und abgedunkelt mit 100  $\mu\text{l}$  eines fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpers (Alexa-Fluor® goat anti-mouse 594; 1:500 in PBS) inkubiert (Tabelle 2.8).

Zur Anfärbung des Zytoskeletts wurden die Zellen für 20 Minuten in Phalloidin-Alexa 488, einem fluoreszenz-markierten Cyclopeptid, welches an Aktin bindet, inkubiert. Dafür wurde die Phalloidin-Lösung 1:70 in PBS verdünnt und jedes Deckglas umgedreht auf 100  $\mu\text{l}$  abgedunkelt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen zur Anfärbung der Nuklei für 5 Minuten abgedunkelt und bei Raumtemperatur in DAPI-Lösung (1:10.000 in PBS; 500 ng/ml Endkonzentration) inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläschen 3x5 Minuten in PBS gewaschen und mit je einem Tropfen „ProLong™ Diamond Antifade Mountant“ (Invitrogen, Darmstadt) auf einem Objektträger fixiert. Über Nacht konnten die Proben so trocknen und zum Mikroskopieren verwendet werden.

Mikroskopische Aufnahmen wurden an den Fluoreszenzmikroskopen „Axio Vert 200M“ (40x Vergrößerung und Öl) und der Software „AxioVision40 V4.8.2.0“ (Carl Zeiss MicroImaging GmbH 2006-2010) oder am „Axio Imager.M2“ (63x Vergrößerung und Öl) mit der Software „ZEN 2.6 blue edition“ (Carl Zeiss Microscopy GmbH 2018) gemacht und bearbeitet.

**Tabelle 2.18:** Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
Permeabilisierungs- /Blockierungslösung	3 % (v/v) NZS
	0,3 % (v/v) Triton X-100
	100 mM Glycin in PBS

#### 2.2.2.14 Proximity Ligation Assay

Der *Proximity Ligation Assay* (PLA) dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Die Schritte verliefen zunächst wie in Abschnitt 2.2.2.13 beschrieben. Ähnlich zur Immunfluoreszenz wurden  $7 \times 10^4$  HUVEC auf Deckgläschen ausgebracht,

transfiziert und ggf. behandelt. Nach der Antikörperinkubation über Nacht wurde am nächsten Tag das „DuoLink® In Situ Detection Kit“ gemäß Herstellerangaben verwendet; abweichend dazu wurde jedoch die eingesetzte Menge Lösung pro Deckgläschen jeweils auf 80 µl verdoppelt.

### 2.2.3 Versuche am *in vivo* Mausmodell

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurden an der University of Virginia (Charlottesville, VA, USA) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Swapnil Sonkusare am Robert M. Berne Cardiovascular Research Center (CVRC) durchgeführt.

#### 2.2.3.1 Herkunft und Haltung von Mäusen

Die verwendeten C57BL/6 Mäuse wurden von der Firma Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. Alle Versuche wurden von dem University of Virginia Animal Care and Use Committee genehmigt.

Die verwendeten Wildtyp-C57BL/6-Mäuse waren in der Regel männlich und um die 10 Wochen alt. Für Untersuchungen auf die Auswirkungen einer fettreichen Ernährung wurden Mäuse verwendet, die ab dem Alter von 6 Wochen über 14 Wochen eine zu 60 % fetthaltige Ernährung bekommen hatten. Als Kontrolle dienten Mäuse, die mit einer 10 % fetthaltigen Ernährung gefüttert wurden (Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA).

Alle Mäuse wurden vor den Versuchen vorschriftsmäßig mit einer intraperitoneal injizierten Überdosis Natrium-Pentobarbital (150 mg/kg) und anschließendem Genickbruch euthanasiert.

#### 2.2.3.2 *En face* Immunfärbung

Für *en face* Immunfärbungen wurden mesenteriale Arterien dritter Ordnung sowie pulmonale Arterien vierter Ordnung und die thorakale Aorta verwendet. Nach der fachgerechten Euthanasie der Mäuse wurde der Darm, die Lunge bzw. die Aorta direkt entnommen und in HEPES-Puffer auf Eis gestellt. Unter Zuhilfenahme feiner Scheren und Pinzetten wurde dann unter einem Binokular das gewünschte Gefäß von Fettgewebe befreit, herausgeschnitten und auf einen Block mit Sylgard-Oberfläche gelegt. Mittels aus Tungstendraht (0,013 mm Stärke) zurechtgeschnittenen Nadeln wurde das Gefäß dann festgepinnt, der Länge nach aufgeschnitten und mit dem Endothel nach oben zeigend gleichmäßig gestretcht, um eine möglichst ebene Fläche zu erhalten.

Das Gewebe wurde anschließend mit eiskaltem Aceton für 10 Minuten bei -20 °C fixiert, 3x5 Minuten in PBS gewaschen und in 0,2 % Triton X-100 in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS

wurde die Arterie in 0,2 % Triton X-100 und 5 % normalem Eseserum (NES) für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Diese Blockierungslösung wurde anschließend ebenfalls für die Antikörperverdünnung benutzt. Der Primärantikörper (anti-GRHL3, Merck Millipore) wurde 1:1.000 eingesetzt und über Nacht mit dem Gewebe bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe zunächst 3x5 Minuten in PBS gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit, Invitrogen, 1:500) in Blockierungslösung abgedunkelt für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Arterie erneut 3x5 Minuten in PBS gewaschen wurde, wurden die Zellkerne mit DAPI (300 nM in PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und zum Schluss noch einmal wie beschrieben gewaschen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Laser Scanning-Konfokalmikroskop gemacht, die Analyse der Bilder mithilfe der Software „Imaris x64“ (Version 9.2.1, Bitplane AG).

**Tabelle 2.19:** Verwendete Puffer und Lösungen für *en face* Immunfärbungen

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung	
4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES)-Puffer	134 mM	NaCl
	6 mM	KCl
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	2 mM	CaCl <sub>2</sub>
	7 mM	Dextrose
	10 mM	HEPES
Permeabilisierungspuffer	0,2 % (v/v)	Triton X-100 in PBS
Blockierungspuffer	0,2 % (v/v)	Triton X-100
	5 % (v/v)	NES in PBS

### 2.2.3.3 *En face Proximity Ligation Assay*

Die Schritte für den *en face* PLA erfolgten an Tag 1 im Wesentlichen wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben. Als Abweichung wurde dem Blockierungspuffer 100 mM Glycin zugefügt. Die Gefäße wurden zudem über Nacht mit einer Mischung aus zwei Primärantikörpern gegen die jeweiligen Zielproteine (anti-GRHL3; 1:1.000 und anti-eNOS [Klon 3, BD Biosciences]; 1:100 in 0,2 % Triton X-100 und 5 % NES) inkubiert. Tag 2 folgte im Wesentlichen den Schritten aus Abschnitt 2.2.2.14; mit der einzigen Abweichung, dass für jede Probe 50 µl der jeweils benötigten Lösung eingesetzt wurden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Verifizierung der potentiellen Interaktionspartner NONO und SFPQ

In einer vorangegangenen Arbeit in unserer Arbeitsgruppe wurden potentielle Interaktionspartner von GRHL3 mittels Co-Immunpräzipitation und anschließender Massenspektrometrie identifiziert (Dissertation Kohlgrüber, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2016). Die identifizierten Proteine sind in der Literatur gut beschrieben und zumeist an der Transkriptions- und Translationskontrolle beteiligt; so ist etwa *Heat Shock Protein Family A5* (HSPA5) als Chaperon in der korrekten Faltung von Proteinen im Lumen des endoplasmatischen Retikulums involviert<sup>78-80</sup>. Ebenfalls als Chaperon agiert *Stress-70 Protein, Mitochondrial* (HSPA9): in den Mitochondrien ist es durch Stabilisierung der Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern an der Erythropoese beteiligt<sup>81, 82</sup>. Als Teil des Initiator Komplexes für die Proteinsynthese assoziiert *Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit L* (EIF3L) mit der 40S-Untereinheit der Ribosomen und rekrutiert spezifisch mRNAs, die in der Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose involviert sind<sup>83-85</sup>.

Zwei andere identifizierte Proteine waren im Kontext dieser Arbeit allerdings besonders interessant, nämlich *Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein* (NONO) und *Splicing Factor, Proline- and Glutamine-Rich* (SFPQ). Diese Proteinen können ein Heterodimer bilden und als solches Einfluss auf die Transkriptionsregulation nehmen, indem sie die Funktion der Topoisomerase I modulieren und das Entwinden der DNA-Doppelstränge unterstützen<sup>68</sup>. Für das NONO/SFPQ Heterodimer wurde ebenfalls gezeigt, dass es im *Non-Homologous End-Joining* als Teil der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen eine Rolle spielt<sup>86, 87</sup>. Allein oder im Komplex mit NONO ist SFPQ außerdem ein essentieller Bestandteil des Spleißprozesses von prä-mRNA, da es mit dem Spleißosomkomplex C assoziiert<sup>69, 70</sup>. Als Spleißfaktor ist SFPQ unter anderem auch am alternativen Spleißen des CD45 Gens in humanen T-Zellen beteiligt<sup>72</sup>.

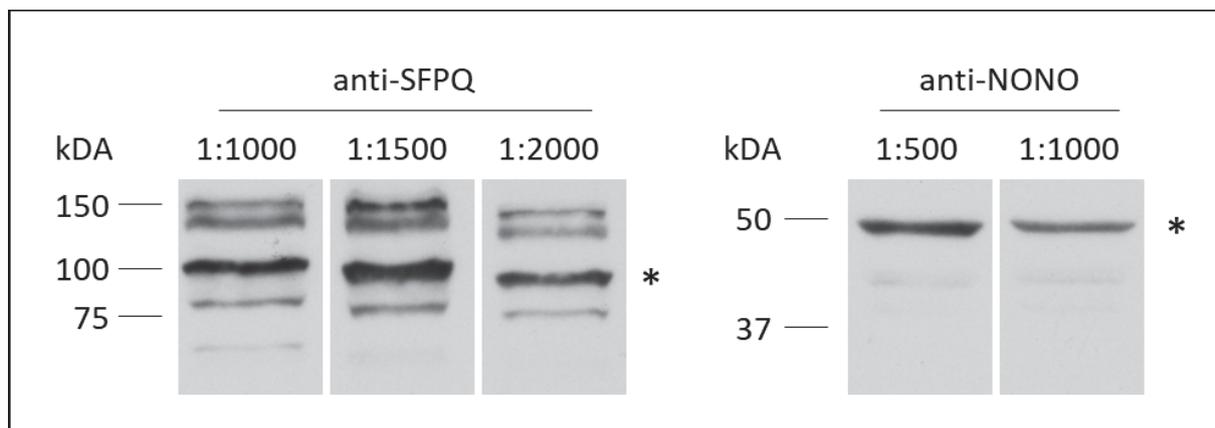
Humanes GRHL3 liegt in drei Isoformen vor, von denen die Isoform 3 genau gegenteilige Funktionen zu Isoform 1 und 2 hat. Diese verschiedenen Isoformen werden von einem einzigen Gen transkribiert; Isoform 3 entsteht durch alternatives Spleißen, dessen Mechanismen allerdings nicht näher bekannt sind. Da NONO und SFPQ im Spleißprozess involviert sind, könnte es sein, dass GRHL3 mit ihnen sein eigenes alternatives Spleißen reguliert. Aus diesem Grund fokussiert der erste Teil dieser Arbeit auf der Verifizierung der potentiellen Interaktionspartnern NONO und SFPQ.

Um zu verifizieren, ob GRHL3 tatsächlich in einem Proteinkomplex mit NONO und SFPQ vorliegt und mit diesen interagiert, wurden verschiedene experimentelle Ansätze verwendet. Als Erstes wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt, mit dem die gemeinsame Anwesenheit in einem Proteinkomplex nachweisbar ist. Mit dem *Proximity Ligation Assay* (PLA), einer immunfluoreszenzbasierten Methode, wurde als Zweites die räumliche Nähe der Proteine zueinander sowie ihre Lokalisation innerhalb

der Zelle analysiert. Mithilfe beider Ansätze sollte so ein vollständiges Bild über die Interaktion zwischen GRHL3 und NONO bzw. SFPQ gewonnen werden.

### 3.1.1 Test der NONO- und SFPQ-Antikörper im Immunoblot

Bevor die Co-Immunpräzipitation zum Nachweis der Protein-Protein-Interaktion durchgeführt werden konnte, wurden die Antikörper gegen NONO und SFPQ zunächst auf ihre Verwendbarkeit zur Immundetektion im Western Blot getestet. Hierfür wurden mehrere Aliquots von Lysaten unbehandelter primärer humaner Endothelzellen gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde dann zerschnitten und die einzelnen Teile für den Proteinnachweis mit verschiedenen Verdünnungen der entsprechenden Antikörper inkubiert (Abbildung 3.1).

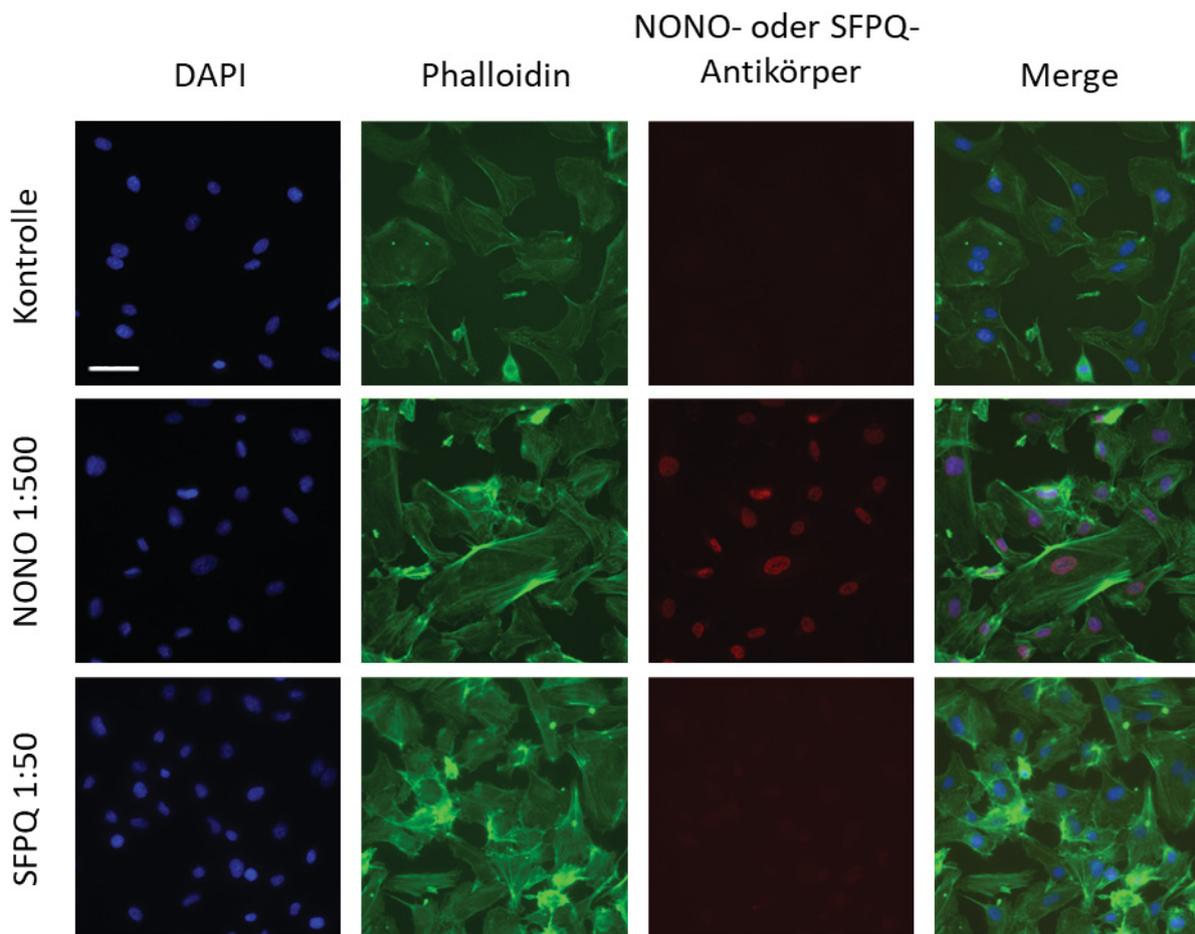


**Abbildung 3.1: Test der anti-NONO- und anti-SFPQ-Antikörper auf Anwendbarkeit im Immunoblot.** 50 µg Aliquots von Lysaten aus unbehandelten primären humanen Endothelzellen wurden im Immunoblot mit verschiedenen Antikörperverdünnungen inkubiert (anti-SFPQ: 1:1.000, 1:1.500, 1:2.000; anti-NONO: 1:500, 1:1.000). \*markiert die entsprechende Bande auf der erwarteten Höhe von 100 kDa (SFPQ) bzw. 50 kDa (NONO).

Wie der Abbildung 3.1 zu entnehmen ist, wird SFPQ bereits mit einer Antikörperverdünnung von 1:2.000; NONO mit einer Verdünnung von 1:1.000 ausreichend sensitiv detektiert. Beide Antikörper sind somit für die Proteindetektion im Immunoblot geeignet.

### 3.1.2 Test der NONO- und SFPQ-Antikörper in der Immunfluoreszenz

Als nächstes wurde geprüft, ob die Antikörper für NONO und SFPQ für einen Nachweis mittels Immunfluoreszenz geeignet sind. Auf Deckgläschen ausgebrachte, primäre Endothelzellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen des NONO- oder SFPQ-Antikörpers inkubiert.

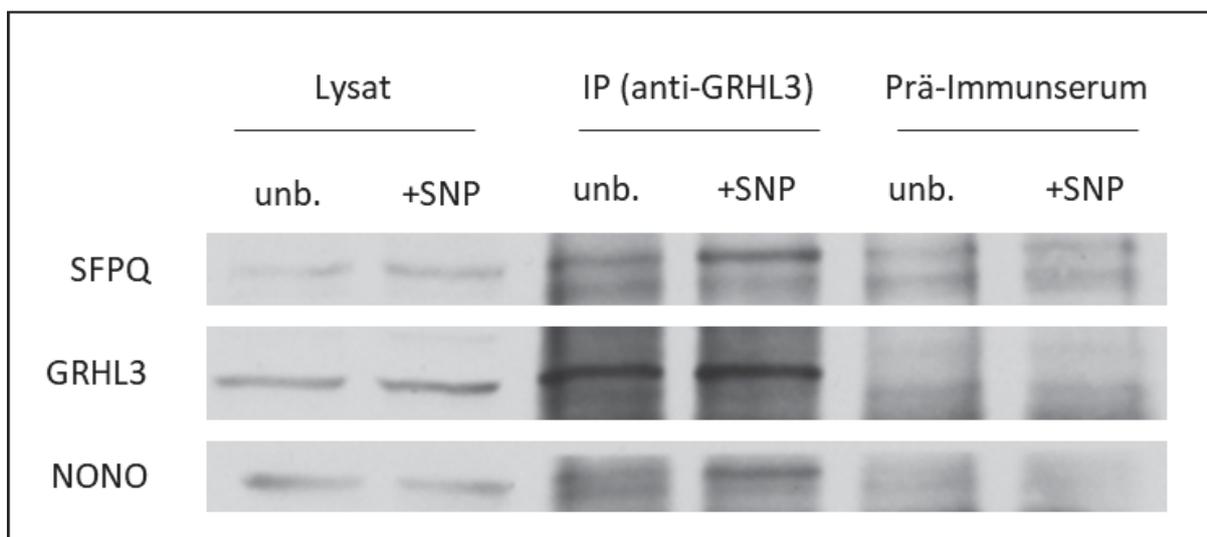


**Abbildung 3.2: Test von anti-NONO- und anti-SFPQ-Antikörper auf die Eignung für Immunfluoreszenzfärbungen.** Unbehandelte Endothelzellen wurden mit anti-NONO (1:500) und anti-SFPQ (1:50) inkubiert; in der Kontrolle wurde kein Primärantikörper eingesetzt. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) und das Zytoskelett mit Phalloidin-Alexa-488 (grün) gegengefärbt. Die Färbungen mit dem jeweiligen Antikörper sind rot dargestellt. Der Maßstabsbalken zeigt 50  $\mu$ m an.

Abbildung 3.2 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der für den NONO-Antikörper idealen 1:500-Verdünnung. Als nukleäres Protein war die Kernlokalisierung zu erwarten und ist hier gut erkennbar, sodass dieser Antikörper für PLAs geeignet sein sollte. Da für den SFPQ-Antikörper auch bei einer Verdünnung von 1:50 keine Färbung erkennbar war, wurde dieser nicht für die folgenden PLAs eingesetzt.

### 3.1.3 Co-Immünpräzipitation von NONO und SFPQ mit GRHL3

Nachdem die Antikörper gegen NONO und SFPQ erfolgreich getestet worden waren, konnten sie für einen Western Blot nach Immunpräzipitation von GRHL3 eingesetzt werden. Dafür wurden zunächst unbehandelte und mit dem NO-Donor Natrium-Nitroprussid (*Sodium Nitroprusside*, SNP) behandelte Endothelzellen lysiert. Durch die Zugabe des NO-Donors verschiebt sich das Verhältnis der Transkriptmengen der Isoformen 1 und 3 zugunsten der protektiven Isoform 1, was sich positiv auf die Endothelzellen auswirkt <sup>66</sup>. Außerdem wurde gezeigt, dass es durch Zugabe eines NO-Donors zu einer Erhöhung der Expression von GRHL3 kommt, weshalb erwartet wurde, dass sich eine potentielle Interaktion mit SFPQ bzw. NONO durch eine SNP-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen verstärken würde. Aus den Zelllysaten wurde anschließend GRHL3 mithilfe des GRHL3-Antikörpers präzipitiert und auf Präzipitation von NONO und SFPQ mittels SDS-PAGE und Immunoblot untersucht.



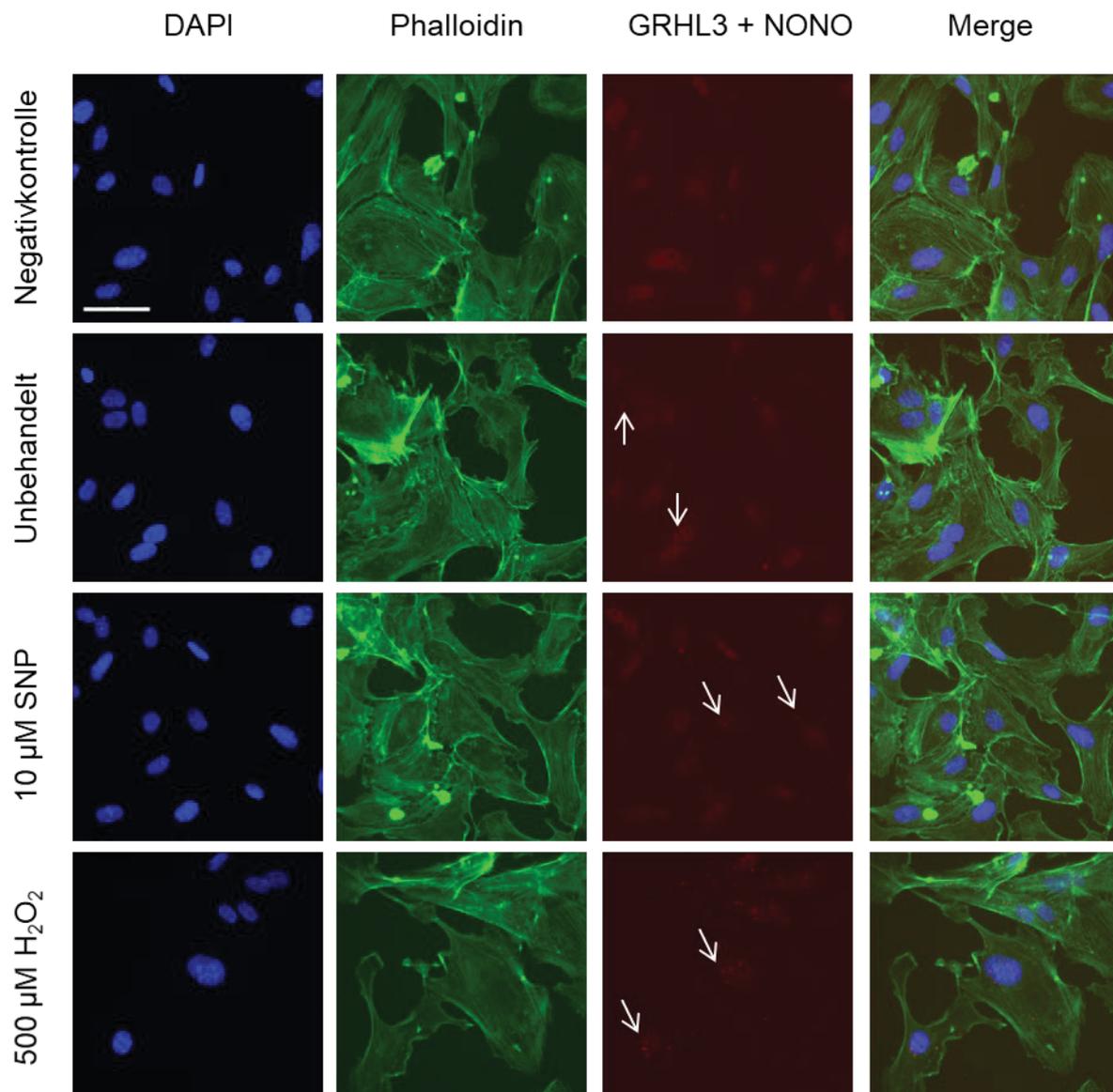
**Abbildung 3.3: Detektion von NONO und SFPQ nach Immunpräzipitation von GRHL3.** Unbehandelte (unb.) oder für 18 Stunden mit 10  $\mu$ M SNP behandelte (+SNP) Endothelzellen wurden lysiert und der GRHL3-Antikörper zur Immunpräzipitation (IP) eingesetzt. Als Negativkontrolle für die IP wurde anstelle des GRHL3-Antikörpers Prä-Immunsersum aus dem Tier, in dem der GRHL3-Antikörper generiert worden war, verwendet (Prä-Immunsersum). Zum Vergleich wurden 50  $\mu$ g des Ausgangslysats aufgetragen (Lysat).

Durch die Inkubation der Membran mit den Antikörpern gegen NONO und SFPQ konnte gezeigt werden, dass nach einer Präzipitation von GRHL3 sowohl NONO als auch SFPQ nachweisbar sind, die beiden Proteine also mit GRHL3 in einem Komplex vorliegen (Abbildung 3.3). Wurden die Zellen im Vorfeld mit dem NO-Donor SNP behandelt, ist sowohl die präzipitierbare Proteinmenge von GRHL3 als auch die Interaktion mit NONO und SFPQ deutlich erhöht.

### 3.1.4 GRHL3 und NONO interagieren *ex vivo*

Zum weiteren Nachweis der Interaktion zwischen GRHL3 und NONO wurde als nächstes der PLA durchgeführt, mit dem bestimmt werden kann, ob sich zwei Proteine innerhalb einer Zelle räumlich nahe genug sind, um zu interagieren. Da sich im Antikörpertest zeigte, dass SFPQ nicht für die Immunfluoreszenzfärbung geeignet ist, wurde zunächst nur die potentielle Interaktion zwischen GRHL3 und NONO untersucht. Wie bereits unter 3.1.3 beschrieben, verstärkt die Zugabe eines NO-Donors die Expression von GRHL3. Durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird in der Zelle hingegen eine Stressantwort ausgelöst, die sich negativ auf das Endothel auswirken kann.

Um mögliche Einflüsse auf die Interaktion zwischen GRHL3 und NONO als Reaktion auf solch gegensätzliche Stimuli zu untersuchen, wurde ein Teil der Endothelzellen im Vorfeld mit einem NO-Donor bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelten Endothelzellen.



**Abbildung 3.4: Interaktion zwischen GRHL3 und NONO in Endothelzellen.** Unbehandelte oder für 18 Stunden mit 10  $\mu$ M SNP oder 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelte Endothelzellen wurden mit den Antikörpern gegen endogenes GRHL3 und NONO inkubiert und am nächsten Tag mit dem „DuoLink® In Situ Detection Kit“ gefärbt. Die Negativkontrolle erhielt keinen Primärantikörper. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) und das Zytoskelett mit Phalloidin-Alexa-488 (grün) gegengefärbt. Die Interaktion zwischen GRHL3 und NONO sind als Punkte (rot) dargestellt und beispielhaft mit weißen Pfeilen markiert. Der Maßstabsbalken zeigt 50  $\mu$ m an.

Die in Abbildung 3.4 deutlich erkennbaren Signale bei GRHL3 + NONO (kleine rote, scharf umrissene Punkte) in unbehandelten Endothelzellen zeigen, dass eine Interaktion zwischen endogenem GRHL3 und NONO unter physiologischen Bedingungen stattfindet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Interaktionen vorrangig im Zellkern stattfinden.

Eine Behandlung mit dem NO-Donor SNP hatte keine feststellbaren Änderungen in der Interaktion zwischen den beiden Proteinen im Vergleich zu unbehandelten

Endothelzellen zur Folge. Anders verhielt es sich bei Zugabe von 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , die in einen deutlichen Anstieg der Anzahl der Interaktionssignale resultierte.

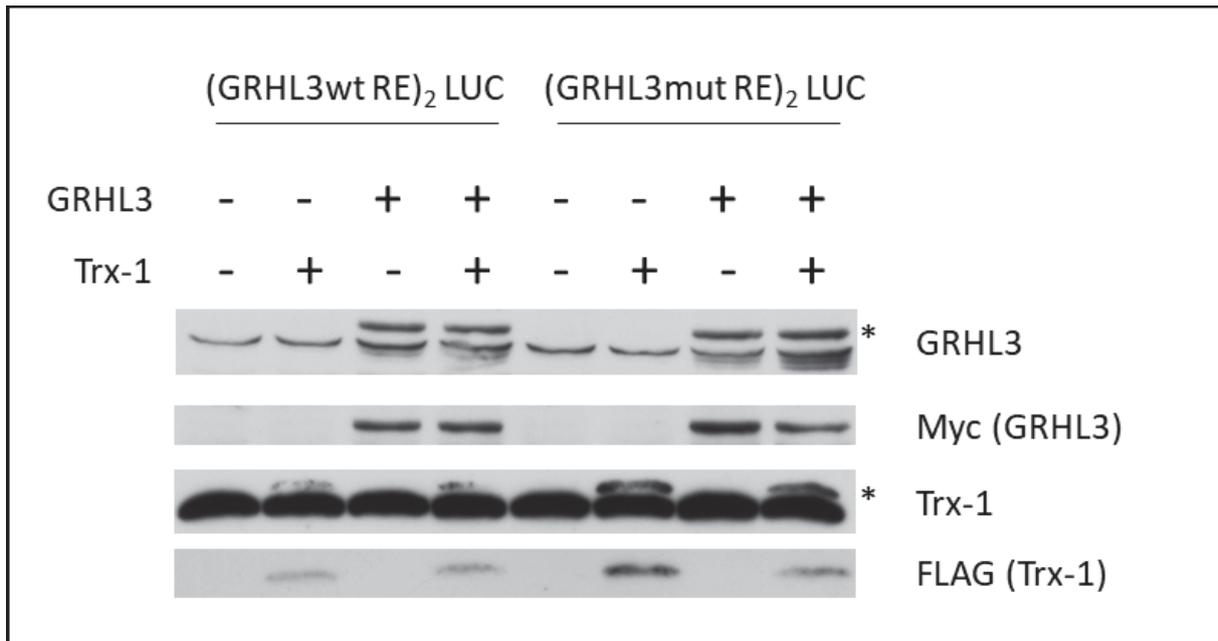
### 3.2 Regulation der transkriptionellen Aktivität von GRHL3 durch Thioredoxin-1

In vorangegangenen Projekten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass humanes GRHL3 in den Endothelzellen promigratorische und antiapoptotische Eigenschaften besitzt. Da GRHL3 ein Transkriptionsfaktor ist, ist es naheliegend, dass diese Eigenschaften unter anderem durch Transkriptionsaktivierung von Zielgenen, die wiederum Einfluss auf Migration und Apoptose haben, gesteuert werden. Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren kann neben Protein-Protein-Interaktion auch über deren Redoxstatus reguliert werden. Da nicht bekannt ist, ob GRHL3 durch Veränderungen des Redoxstatus reguliert wird, wurde in einem funktionellen Ansatz untersucht, ob die Oxidoreduktase Thioredoxin-1 (Trx-1) auf die Transkriptionsaktivität von GRHL3 Einfluss nimmt.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden HEK293T-Zellen mit drei Plasmiden co-transfiziert. Das erste enthält eine Sequenz, die für das Reportergen Luziferase codiert und unter der transkriptionellen Kontrolle eines Minimalpromotors steht, der nur über eine TATA-Box verfügt<sup>88</sup> und für eine basale Transkription des Reportergens sorgt. Zusätzlich weist das Konstrukt zwei Kopien einer GRHL3-spezifischen Bindestelle 5' zum Minimalpromotor auf, durch die die Luziferaseexpression spezifisch von GRHL3 aktiviert werden kann<sup>62</sup>. Aufgrund dieses speziellen Aufbaus des Konstrukts kann die Luziferaseexpression nur bei erfolgreicher Bindung von GRHL3 an die spezifische Bindestelle verstärkt aktiviert werden. Da stets die gleiche RNA synthetisiert wird und somit RNA-Stabilität und Translationseffizienz stets identisch sind, kann die Luziferasemenge, die anhand der Enzymaktivität bestimmt werden kann, als direktes Maß für die Transkriptionsaktivität von GRHL3 genutzt werden.

Als Spezifitätskontrolle wurde ein Reportergenkonstrukt verwendet, das Mutationen an zwei Positionen der GRHL3-Bindestellen aufweist, die für dessen Bindung an die DNA essentiell sind<sup>53</sup>. Das zweite Plasmid war entweder ein Expressionsvektor für GRHL3 mit C-terminalem Myc-Epitop-*tag* oder der entsprechende Leervektor. Beim dritten Plasmid handelte es sich entweder um einen Expressionsvektor für Thioredoxin-1 (Trx-1) mit C-terminalem FLAG-Epitop-*tag* oder den entsprechenden Leervektor. Zur Bestimmung der Transkriptionsfaktoraktivität von GRHL3 wurde die Luziferaseaktivität in Lysaten der so transfizierten Zellen bestimmt.

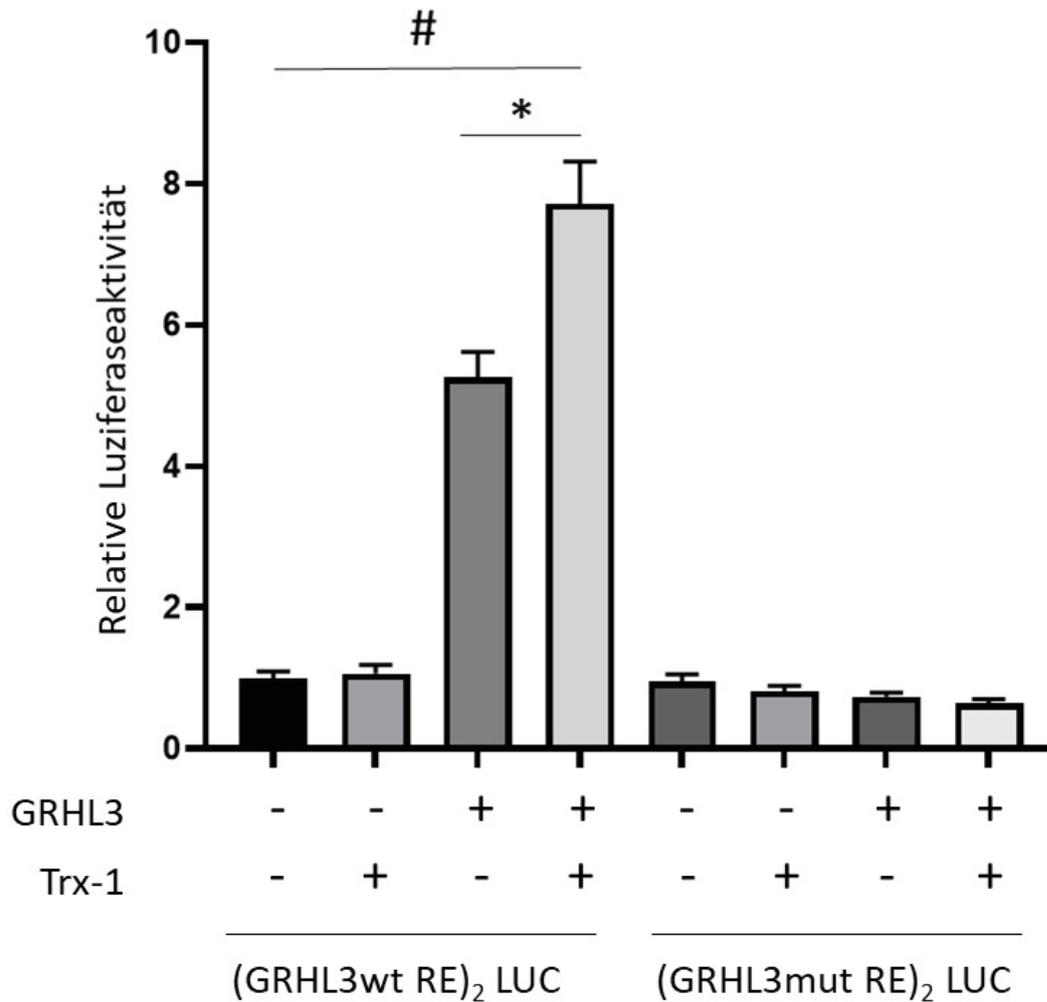
Um auszuschließen, dass die zu beobachtenden Effekte auf unterschiedlichen Proteinlevel nach Überexpression basieren, wurde parallel ein Expressionsnachweis für GRHL3 und Trx-1 durchgeführt. Zur Unterscheidung der mithilfe von Expressionsvektoren überexprimierten GRHL3 und Trx-1 von endogenen GRHL3 bzw. Trx-1-Proteinlevel, wurden neben den Antikörpern gegen GRHL3 und Trx-1 auch Antikörper, die gegen das Myc-Epitop-*tag* für GRHL3 bzw. gegen das FLAG-Epitop-*tag* für Trx-1 gerichtet sind, verwendet (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5: Repräsentativer Immunoblot zum Nachweis der Expression von GRHL3 und Thioredoxin-1 nach Co-Transfektion.** HEK293T wurden mit einem GRHL3-spezifischen Luziferase-Reporterplasmid ((GRHLwt RE)<sub>2</sub> LUC) und Expressionsvektoren für GRHL3 und Thioredoxin-1 (Trx-1) co-transfiziert. Als Spezifitätskontrollen wurden identische Transfektionen mit einem Luziferase-Reporterplasmid, in dem die GRHL3-Bindestellen mutiert sind ((GRHL3mut RE)<sub>2</sub> LUC) durchgeführt. Die Expression von GRHL3 und Trx-1 wurde im Immunoblot mit Antikörpern gegen endogenes GRHL3 und Trx-1 bzw. gegen die Epitop-*tag* markierten, überexprimierten Protein (anti-Myc für GRHL3 und anti-FLAG für Trx-1) nachgewiesen. \*zeigen die überexprimierten Proteine an, welche mit den Antikörpern gegen die endogenen Proteine ebenfalls nachweisbar sind.

Im Immunoblot (Abbildung 3.5) zeigte sich gleichmäßige Expression sowohl der endogenen als auch der zusätzlich exprimierten Proteine.

Die Auswertung der zugehörigen Luziferase-Reportergen-Assays ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Die Werte wurden dabei auf die Luziferaseaktivität der Co-Transfektion des Luziferase-Reportergens mit wildtypischer GRHL3-Bindestelle vor dem Minimalpromotor mit den beiden Leervektoren normiert.



**Abbildung 3.6: Trx-1 verstärkt die Transkriptionsaktivität von GRHL3.** HEK293T-Zellen wurden mit einem GRHL3-spezifischen Luciferase-Reporterplasmid ((GRHLwt RE)<sub>2</sub> LUC) und Expressionsvektoren für GRHL3 und Thioredoxin-1 (Trx-1) co-transfiziert. Als Spezifitätskontrollen wurden identische Transfektionen mit einem Luciferase-Reporterplasmid, in dem die GRHL3-Bindestellen mutiert sind ((GRHL3mut RE)<sub>2</sub> LUC) durchgeführt. 21 Stunden nach der Transfektion wurde die Luciferaseaktivität in Lysaten gemessen. Der Mittelwert der Luciferaseaktivitäten in den Zellen, die mit dem GRHL-3 spezifischen Luciferase-Reporterplasmid und anstelle der GRHL3- und Trx-1-Expressionsvektoren mit den entsprechenden Leervektoren co-transfiziert worden waren, wurde zu 1 gesetzt (n = 7, \*p<0,05; #p<0,05, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey Test)

In Abwesenheit von GRHL3 und Trx-1 unterschied sich die Aktivität der Luciferase in den Proben, die mit dem Reporter gen mit wildtypischer GRHL3-spezifischer Bindestelle vor dem Minimalpromotor transfiziert worden waren, nicht signifikant von den Proben, die mit dem Reporter gen mit mutierter Bindestelle transfiziert worden waren. Diese Beobachtung lässt sich damit begründen, dass durch den vor dem Luciferasegen sitzende Minimalpromotor eine basale Transkription erfolgt und die Mengen an endogenem GRHL3 anscheinend nicht ausreichen, um die Transkription des Luciferase-Reporters zu aktivieren. Eine Überexpression von Trx-1 allein hatte

ebenfalls keinen Effekt auf die Luziferaseaktivität, sodass eine GRHL3-unabhängige, Trx-1-vermittelte Aktivierung des Reportersystems auszuschließen ist. Überexpression von GRHL3 hingegen steigerte die Luziferaseaktivität auf das ca. Fünffache. Wurde zusätzlich zu GRHL3 noch Trx-1 überexprimiert, wurde eine weitere Erhöhung der Luziferaseaktivität beobachtet, was belegt, dass Trx-1 die transkriptionelle Aktivität von GRHL3 erhöht.

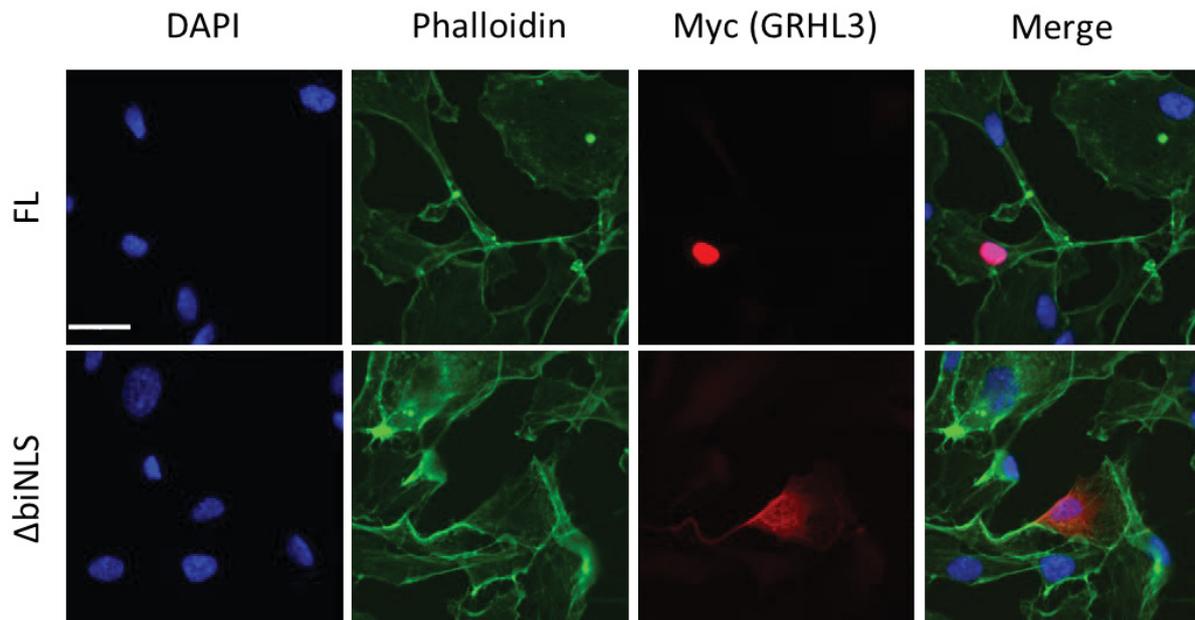
### 3.3 Extranukleäre Funktionen von GRHL3 und Interaktion mit eNOS

In vorausgegangenen Projekten zur Charakterisierung von Struktur-Funktions-Beziehungen im GRHL3-Protein wurden Deletionsmutanten hergestellt, denen der gesamte N-Terminus, die DNA-Bindedomäne, der uncharakterisierte Bereich zwischen der DNA-Bindedomäne oder ein zweiteiliges, mit der Software „cNLSMapper“<sup>89</sup> vorhergesagtes, zweiteiliges nukleäres Lokalisationssignal fehlt.

Diese Mutanten waren auf die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung untersucht worden, wobei sich zeigte, dass nur die Deletionsmutante, der die Dimerisierungsdomäne fehlt, die Transkription des zuvor beschriebenen GRHL3-spezifischen Luziferase-Reporters aktivieren konnte. Da auch die Mutante mit der Deletion des potentiellen NLS nicht mehr in der Lage war, Transkription zu aktivieren, könnte man vermuten, dass diese Mutante nicht mehr in den Zellkern importiert werden kann, was eine Transkriptionsaktivierung verhindern würde. Zudem ließe sich mit einer derartigen Mutante klären, ob GRHL3 möglicherweise extranukleäre Funktionen hat.

#### 3.3.1 Intrazelluläre Lokalisation der NLS-defizienten Mutante

Um die Frage zu klären, ob die fehlende Fähigkeit der Mutante, der das vorhergesagte zweiteilige Kernlokalisierungssignal fehlt, Transkription zu aktivieren, auf die extranukleäre Lokalisation dieser Mutante zurückzuführen ist, wurde die Lokalisation des Proteins in primären humanen Endothelzellen im Vergleich mit dem kompletten (*full-length*) Protein untersucht. Dazu wurde die Zellen mit Expressionsvektoren für das intakte Protein (GRHL3-FL) und die NLS-defiziente Mutante (GRHL3- $\Delta$ biNLS) transfiziert und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abbildung 3.7).

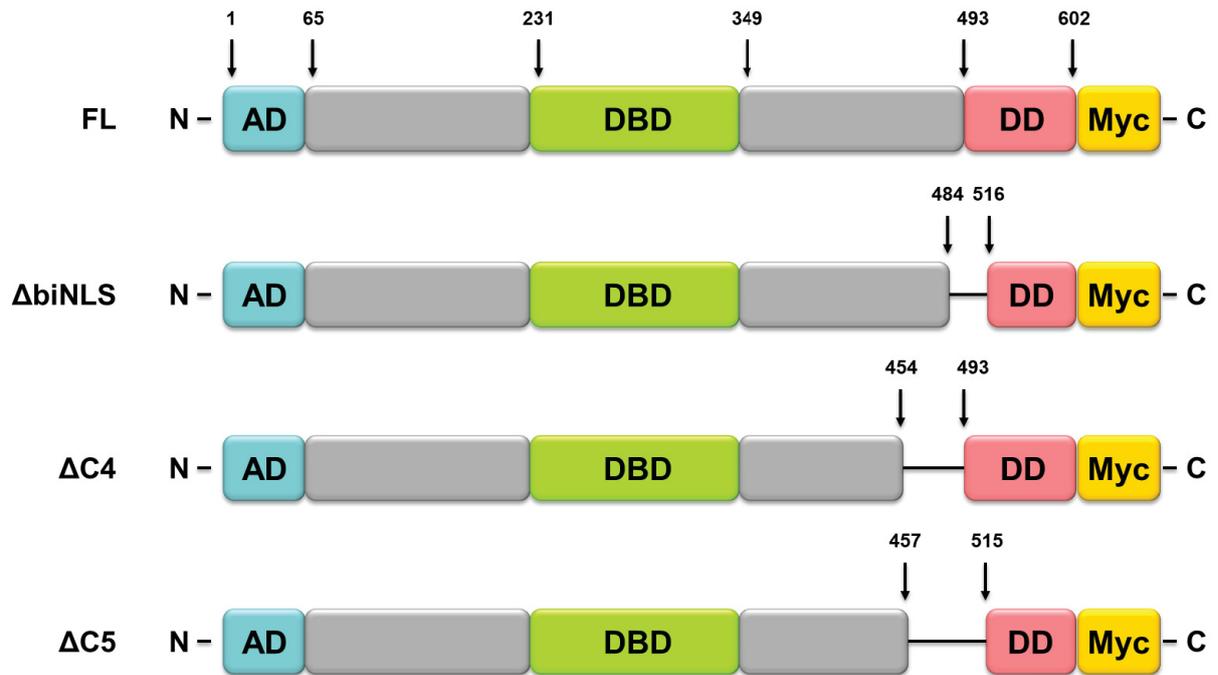


**Abbildung 3.7: Intrazelluläre Lokalisation von GRHL3- $\Delta$ biNLS.** Primäre humane Endothelzellen wurden mit Expressionsvektoren für GRHL3-FL oder GRHL3- $\Delta$ biNLS transfiziert. 21 Stunden nach der Transfektion wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Myc-Antikörper (rot) durchgeführt. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) und das Zytoskelett mit Phalloidin-Alexa-488 (grün) gefärbt. Merge zeigt die Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken zeigt 30  $\mu$ m.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3.7 zeigen, dass GRHL3-FL ausschließlich in den Zellkern transloziert, das GRHL3- $\Delta$ biNLS Protein hingegen vorwiegend im Zytoplasma vorliegt. Allerdings kann basierend auf diesen Färbungen nicht ausgeschlossen werden, dass GRHL3- $\Delta$ biNLS auch in den Zellkern gelangt.

Aus diesem Grund wurden zwei weitere GRHL3-Varianten eingesetzt, die im C-terminalen Bereich nahe des zweiteiligen NLS Deletionen aufweisen. Eine dieser Mutanten, GRHL3- $\Delta$ C4, verfügt über eine Deletion N-terminal zu dem zweiteiligen NLS (Aminosäuren 454-493) und wurde bereits in früheren Projekten unserer Arbeitsgruppe hergestellt. Funktionale Analysen dieser Mutante zeigten, dass sie nicht in der Lage war, Transkription eines GRHL3-abhängigen Reportergens zu aktivieren. Die zweite Mutante, GRHL3- $\Delta$ C5, kombiniert die Deletionen von GRHL3- $\Delta$ C4 und GRHL3- $\Delta$ biNLS (Aminosäuren 457-515). Hierfür musste zunächst der entsprechende Expressionsvektor hergestellt werden. Die drei Deletionsmutanten sind schematisch in Abbildung 3.8 dargestellt.

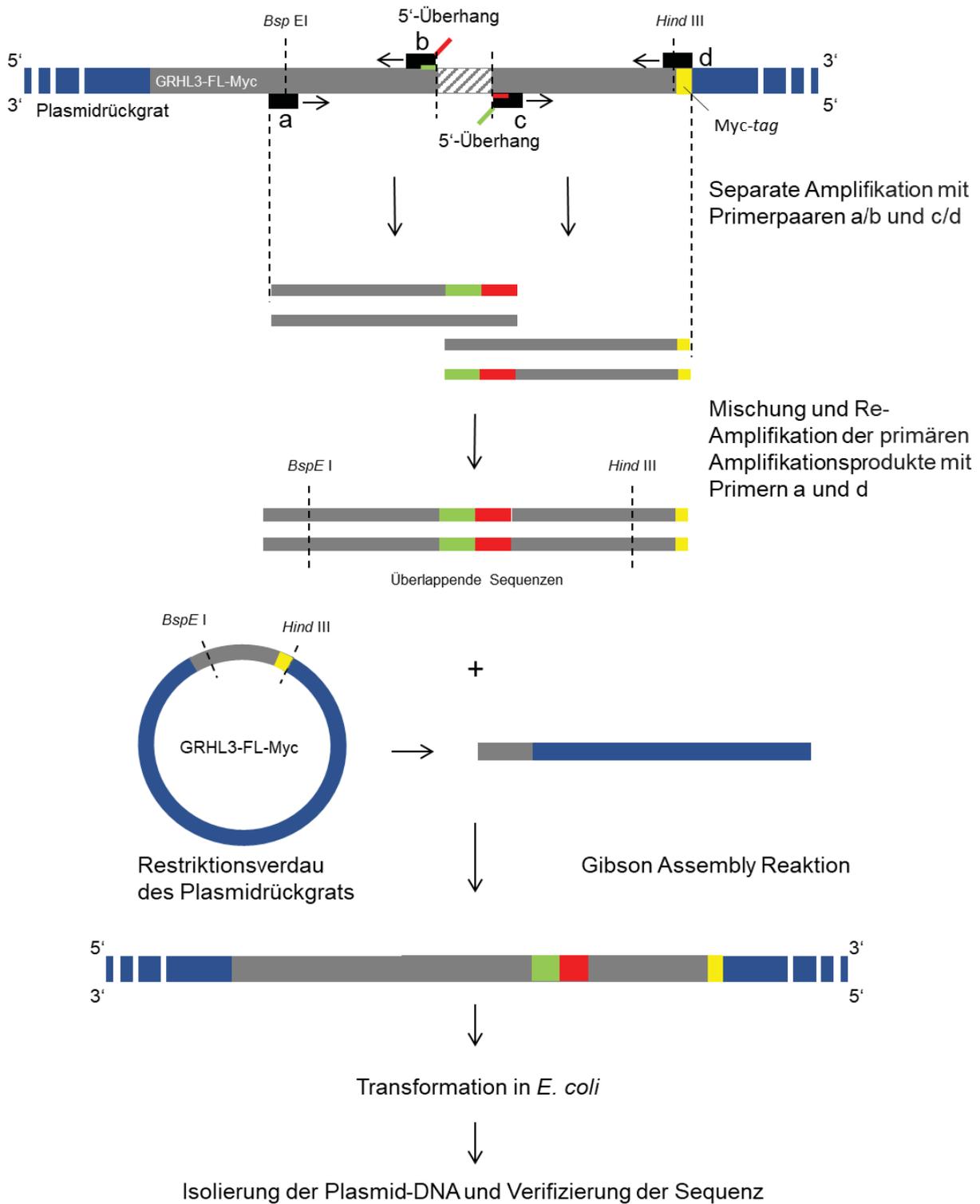
GRHL3-



**Abbildung 3.8: GRHL3-Deletionsmutanten im Bereich des vorhergesagten zweiteiligen Lokalisationssignals.** FL bezeichnet das komplette (*full-length*) Protein, hier markieren die Zahlen die publizierten Domänen <sup>47</sup>. AD bezeichnet die Aktivierungsdomäne, DBD die DNA-Bindedomäne und DD die Dimerisierungsdomäne. In den Mutanten zeigen die Pfeile die Aminosäuren an, zwischen denen die Deletionen liegen. Alle Varianten sind zur Detektion mit einem C-terminalen Myc-Epitop-*tag* versehen.

### 3.3.2 Herstellung eines Expressionsvektors für die GRHL3-Deletionsmutante GRHL3- $\Delta$ C5

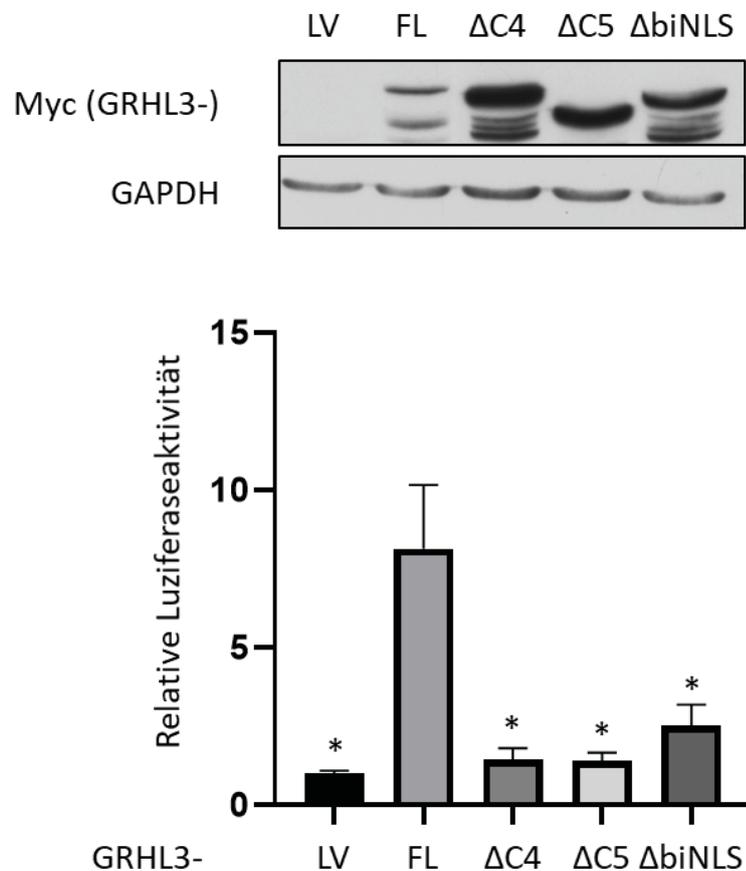
Für die Herstellung der Deletionsmutante GRHL3- $\Delta$ C5 wurde der Expressionsvektor für GRHL3-FL-Myc als Ausgangsplasmid verwendet und der für den C-Terminus des Proteins codierende Bereich durch die für die Deletionsmutante codierende Sequenz ersetzt, die mittels *overlap extension PCR*<sup>90</sup> amplifiziert wurde. Um eine Deletion zwischen den Aminosäuren 457 bis 515 im fertigen Protein zu erreichen, wurden spezifische Primer (b und c in Abbildung 3.9) entworfen, die mit 177 Basenpaaren Abstand zueinander in entgegengesetzter Richtung auf der Ausgangs-DNA binden, sodass dieser Bereich bei der Amplifikation in zwei getrennten Reaktionsansätzen ausgespart wurde. Die beiden zentralen, entgegengesetzt ausgerichteten Primer (b und c in Abbildung 3.9) enthalten jeweils einen 10 bp langen 5'-Überhang, der zu der DNA-Sequenz komplementär ist, an die der entgegengesetzte Primer gebunden hat. Dadurch entstehen um 20 bp überlappende DNA-Fragmente, aneinander binden können, sodass sie in einem zweiten Amplifikationsschritt mit den Primern am 5'- und 3'-Ende des Fragments mit der gewünschten Deletion (Primer a und d in Abbildung 3.9) verbunden werden können. Diese Primer enthalten zudem Überlappungen zum Plasmidrückgrat, das mit den Restriktionsenzymen *BspE* I und *Hind* III geöffnet wurde, um die für den C-Terminus von GRHL3 codierende Sequenz zu entfernen. Das so geschnittene Plasmid und das PCR-Fragment mit der Deletion wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aufgereinigt. Danach wurden die beiden aufgereinigten Fragmente in einer *Gibson Assembly* Reaktion kombiniert und dieser Reaktionsansatz in *E. coli* NEB5-alpha transformiert. Aus sechs der hieraus resultierenden Kolonien wurde Plasmid-DNA über Plasmid-Minipräparationen isoliert und die Identität der Plasmide mithilfe eines diagnostischen Restriktionsverdau bestätigt. Hierbei zeigte sich, dass das gewünschte Plasmid in fünf der untersuchten Kolonien enthalten war. Von drei dieser Plasmid-DNAs wurde der Bereich zwischen der *BspE* I- und der *Hind* III-Restriktionsschnittstelle sequenziert, um Mutationen, die während der einzelnen Amplifikationsschritte entstanden sein könnten, auszuschließen. Bei der Sequenzierung stellten sich alle drei Plasmid-DNAs als korrekt heraus.



**Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Deletionsmutante GRHL3-ΔC5.** Als Ausgangsplasmid wurde GRHL3-FL-Myc verwendet. Der grau schraffierte Bereich stellt den zu deletierenden Bereich dar. Die grünen und roten Abschnitte zeigen die jeweils überlappenden Primersequenzen an. A-d bezeichnen die eingesetzten Primer. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

### 3.3.3 Transkriptionsaktivierung durch NLS-defiziente GRHL3-Deletionsmutanten

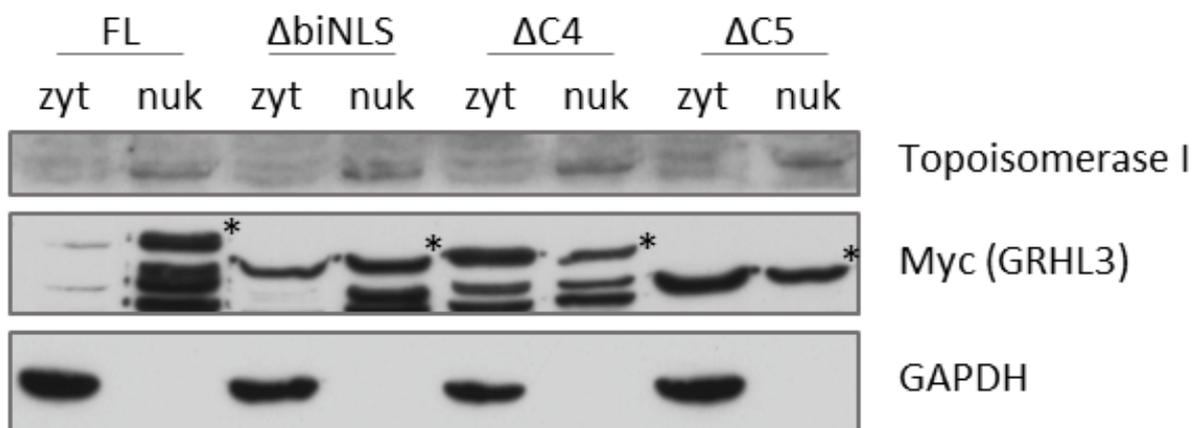
In einem ersten funktionellen Ansatz wurde die Transkriptionsaktivierung der zuvor beschriebenen GRHL3-Mutanten mit Deletionen im Bereich des potentiellen NLS in HEK293T-Zellen untersucht. Hierzu wurde das gleiche Luziferase-Reportersystem wie unter 3.2.1 genutzt, allerdings wurden nur das Luziferase-Reporterplasmid (GRHL3wt RE)<sub>2</sub> LUC und die Expressionsvektoren für die GRHL3-Mutanten co-transfiziert, da die Spezifität schon hinreichend demonstriert worden war; zudem wurde der Trx-1-Expressionsvektor durch einen Leervektor ersetzt, da keine Co-Expression von Trx-1 erfolgen sollte. Als Referenz wurde anstelle der GRHL3-Expressionsvektoren ein entsprechender Leervektor eingesetzt.



**Abbildung 3.10: Transkriptionelle Aktivität verschiedener NLS-defizienter GRHL3-Varianten.** HEK293T-Zellen wurden mit dem GRHL3-spezifischen Luziferase-Reporterplasmid (GRHL3wt RE)<sub>2</sub> LUC und Expressionsvektoren für das komplette GRHL3 (*full-length*, FL), die GRHL3-Deletionsmutanten GRHL3-ΔC4, -ΔC5 oder -ΔbiNLS oder dem entsprechenden Leervektor (LV) co-transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion geerntet. Oben: Nachweis der Expression der GRHL3-Proteine im Immunoblot mit einem anti-Myc-Antikörper. GAPDH diente als Ladekontrolle. Unten: Relative Luziferaseaktivitäten; der Mittelwert in Lysaten der mit dem GRHL3-spezifischen Luziferase-Reporterplasmid und dem Leervektor co-transfizierten Zellen wurde zu 1 gesetzt (n = 3, \*p<0,05 vs FL, Mann-Whitney U Test).

Eine Expressionskontrolle zeigte, dass alle GRHL3-Varianten exprimiert wurden, aber im Vergleich mit dem intakten Protein keine der Mutanten in der Lage war, die Transkription des Reportergens zu aktivieren.

Um eine Aussage zur subzellulären Lokalisation dieser verschiedenen GRHL3-Deletionsmutanten machen zu können, wurden alle Proteine in HEK293T-Zellen exprimiert und eine biochemische Fraktionierung durchgeführt. Dabei wurden die Zelllysate in eine zytosolische und eine nukleäre Fraktion getrennt und diese im Immunoblot analysiert. Zur Kontrolle der Reinheit der Fraktionen wurden das zytosolische Protein GAPDH und das nukleäre Protein Topoisomerase I eingesetzt (Abbildung 3.11).



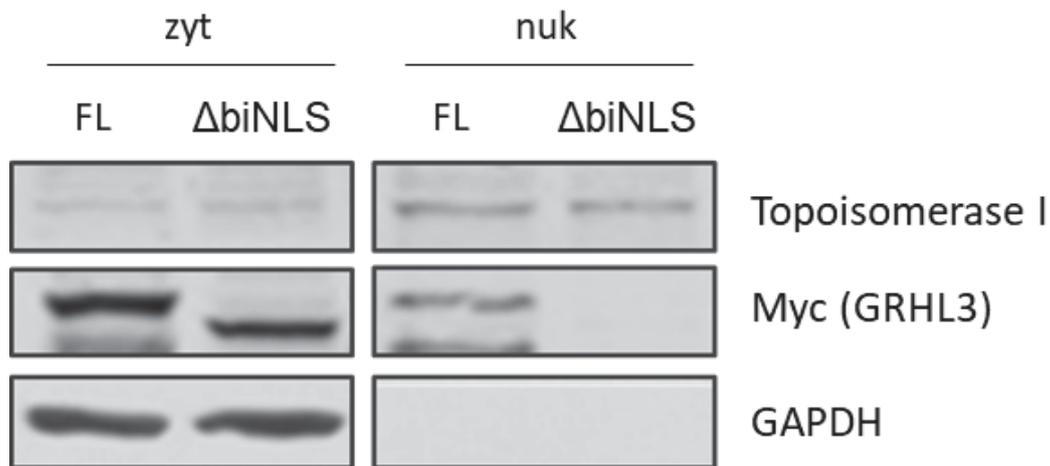
**Abbildung 3.11: Subzelluläre Lokalisation von in HEK293T-Zellen.** HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für das komplette GRHL3-Protein (*full-length*, FL) oder die Deletionsmutanten GRHL3-ΔbiNLS, -ΔC4 und -ΔC5 transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden zytosolische (zyt) und nukleäre (nuk) Fraktionen getrennt. Die Verteilung der GRHL3-Varianten zwischen den Fraktionen wurde im Immunoblot mit einem anti-Myc-Antikörper untersucht; als Reinheitskontrollen für die Fraktionen wurden GAPDH, die sich nicht im Zellkern befindet und Topoisomerase I, die exklusiv im Nukleus lokalisiert ist, genutzt. \*markieren die Proteinbanden mit dem jeweiligen erwarteten Molekulargewicht.

Der Immunoblot in Abbildung 3.11 zeigt, dass es keine Kreuzkontaminationen zwischen den zytosolischen und den nukleären Fraktionen gibt, da GAPDH und Topoisomerase I nur in den jeweils erwarteten Fraktionen nachweisbar waren. Im Gegensatz zu dem intakten GRHL3-Protein, das sich hauptsächlich in der Zellkernfraktion findet, zeigt sich bei allen Deletionsmutanten eine verstärkte Lokalisation im Zytoplasma; allerdings befand sich ein Teil der Proteine in den HEK293T-Zellen immer noch im Zellkern.

Die Untersuchungen in den HEK293T-Zellen wurden zunächst nur als einfaches Screening-System genutzt, der Fokus der Arbeit lag allerdings auf dem Endothel. Daher wurde die Mutante mit der kleinsten Deletion, die zudem nur das vorhergesagte zweiteilige NLS umfasst, auch in primären Endothelzellen mittels biochemischer

Fraktionierung auf ihre subzelluläre Lokalisation hin untersucht. Im Gegensatz zu den in Abbildung 3.7 gezeigten Immunfluoreszenznachweisen hat dieser experimentelle Ansatz den Vorteil, dass hierbei die gesamte Zellpopulation erfasst wird.

Dafür wurden diese Zellen mit Expressionsvektoren für GRHL3-FL und GRHL3- $\Delta$ biNLS transfiziert und die gleiche biochemische Fraktionierung wie zuvor genutzt (Abbildung 3.12).

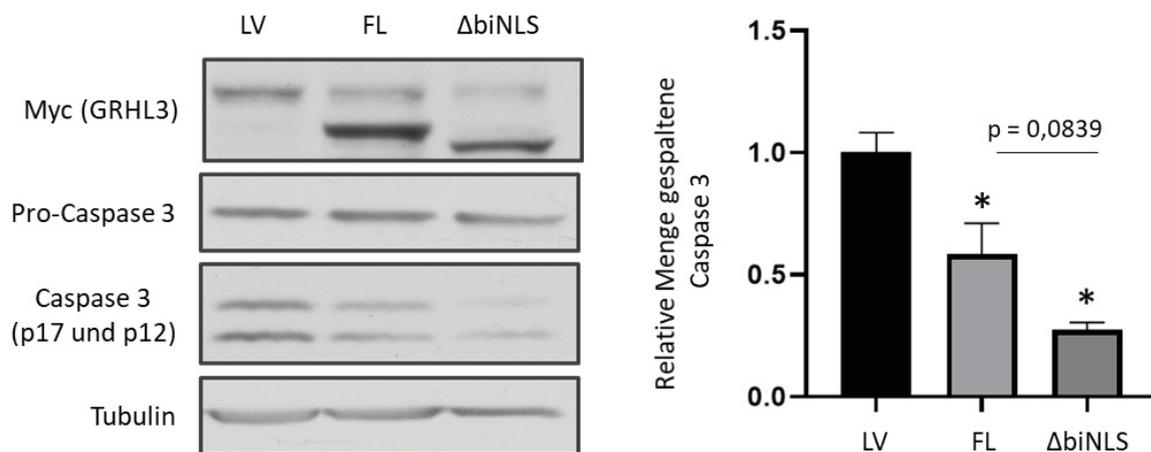


**Abbildung 3.12: GRHL3- $\Delta$ biNLS ist in primären humanen Endothelzellen exklusiv extranukleär lokalisiert.** Primäre humane Endothelzellen wurden mit Expressionsvektoren für das komplette GRHL3-Protein (*full-length*, FL) oder die Deletionsmutante GRHL3- $\Delta$ biNLS transfiziert. 21 Stunden nach der Transfektion wurden zytoplasmische (zyt) und nukleäre (nuk) Fraktionen getrennt. Die Verteilung der GRHL3-Proteine zwischen den Fraktionen wurde im Immunoblot mit einem anti-Myc-Antikörper untersucht, als Reinheitskontrollen für die Fraktionen wurden GAPDH und Topoisomerase I genutzt.

Dem Immunoblot ist zu entnehmen, dass auch in diesem Fall die Fraktionen frei von Kreuzkontaminationen waren. Zudem zeigte sich deutlich, dass das intakte GRHL3-Protein sowohl im Zytosol als auch im Nukleus vorhanden ist, wohingegen GRHL3- $\Delta$ biNLS im Gegensatz zu HEK293T-Zellen ausschließlich im Zytosol vorliegt. Die Translokation in den Zellkern scheint demnach in verschiedenen Zelltypen zu variieren. Da die GRHL3- $\Delta$ biNLS Mutante in primären humanen Endothelzellen ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist, wurde sie im weiteren Verlauf der Arbeit für funktionelle Analysen in diesen Zellen eingesetzt, um mögliche extranukleäre Funktionen von GRHL3 im Endothel aufdecken zu können.

### 3.3.4 Auswirkung von GRHL3- $\Delta$ biNLS auf Endothelzellapoptose

Zunächst wurde untersucht, wie sich eine exklusiv zytosolische Lokalisation auf bekannte Funktionen von GRHL3 auswirkt. Da Überexpression von GRHL3 Endothelzellapoptose inhibiert, wurde zunächst analysiert, ob auch GRHL3- $\Delta$ biNLS antiapoptotisch wirkt. Dazu wurden Endothelzellen mit Expressionsvektoren für das *full-length* Protein sowie für GRHL3- $\Delta$ biNLS transfiziert und die Spaltung von Caspase 3 als Apoptosemarker untersucht. Die Effektorcaspase Caspase 3 ist wie andere Caspasen erst nach proteolytischer Prozessierung der Proform in die Untereinheiten p17 und p12 voll aktiv<sup>91</sup>. Damit kann die Spaltung der Caspase 3 als Maß für Apoptoseinduktion genutzt werden. Daher wurde mittels Immunoblot der relative Anteil geschnittener Caspase 3 im Verhältnis zur ungeschnittenen Proform untersucht.



**Abbildung 3.13: GRHL3- $\Delta$ biNLS inhibiert Endothelapoptose stärker als das *full-length*-Protein.** Primäre humane Endothelzellen wurden mit Expressionsvektoren für das komplette GRHL3-Protein (*full-length*, FL), GRHL3- $\Delta$ biNLS ( $\Delta$ biNLS) oder dem entsprechenden Leervektor (LV) transfiziert. 21 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die GRHL3-Varianten sowie Pro-Caspase 3 und ihre Spaltprodukte p17 und p12 im Immunoblot detektiert, als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Links: Repräsentativer Immunoblot. Rechts: Semi-quantitative Analyse der relativen Menge gespaltener Caspase 3. n = 4 \*p<0,05 vs. LV, one-way ANOVA mit post-hoc Tukey-Test).

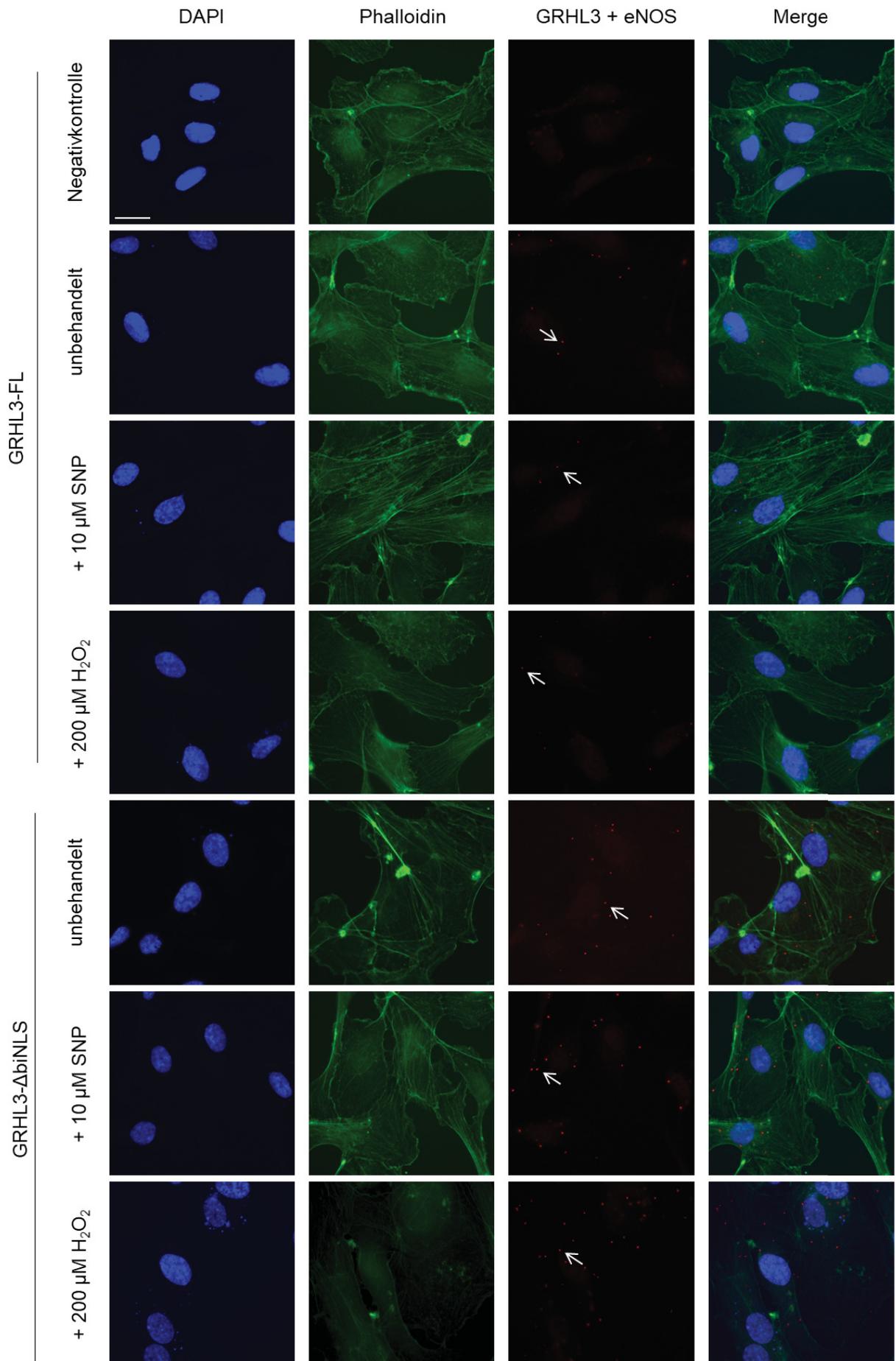
Abbildung 3.13 zeigt, dass die Menge an geschnittener Caspase 3 sowohl bei Überexpression von GRHL3-FL als auch von GRHL3- $\Delta$ biNLS im Vergleich zur Leervektorkontrolle deutlich reduziert wurde, was beweist, dass auch die extranukleär lokalisierte Mutante eine antiapoptotische Funktion hat. Beim Vergleich der beiden GRHL3-Proteine zeigte sich ein Trend dahingehend, dass der antiapoptotische Effekt bei Überexpression des extranukleären Proteins stärker ist als bei dem nativen Protein.

Durch diese Beobachtung stellte sich die Frage, wie GRHL3- $\Delta$ biNLS in der Lage sein kann, eine für das intakte GRHL3 beobachtete Funktion, nämlich die Inhibition von Endothelzellapoptose, auszuführen, obwohl es außerhalb des Zellkerns vorliegt und somit nicht die Transkription von Zielgenen, die relevant für Apoptoseinhibition sind, aktivieren kann.

In unserer Arbeitsgruppe war bereits gezeigt worden, dass eine Überexpression von GRHL3 die aktivierende Phosphorylierung an Serin 1177 der endothelialen NO-Synthase (eNOS) verstärkt. Die damit verbundene Erhöhung der zellulären NO-Spiegel trägt auch zum Apoptoseschutz bei. Es ist vorstellbar, dass der extranukleäre Pool von GRHL3 direkt mit eNOS interagiert und auf diesem Weg zur erhöhten Phosphorylierung des Enzyms und damit zur Apoptoseinhibition beiträgt. Dies könnte auch den möglicherweise stärkeren antiapoptotischen Effekt der extranukleären GRHL3-Mutante erklären, da sich bei dieser das gesamte exprimierte Protein außerhalb des Zellkerns befindet. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde im nachfolgenden Teil der Arbeit eine Interaktion der beiden Proteine untersucht.

### 3.3.5 Interaktion von GRHL3 und endothelialer NO-Synthase (eNOS)

Um zu untersuchen, ob eNOS mit GRHL3 und möglicherweise verstärkt mit der extranukleären Mutante GRHL3- $\Delta$ biNLS in Endothelzellen interagiert, wurden PLAs in primären humanen Endothelzellen durchgeführt. Um die beiden Proteine vergleichen zu können, wurden beide in den Zellen exprimiert und die PLAs mit einem gegen das Myc-Epitop-*tag* gerichteten Antikörper durchgeführt: für die endogene eNOS wurde entsprechend ein eNOS-Antikörper verwendet. Mithilfe des „DuoLink® In Situ Detection Kits“ konnte dann überprüft werden, ob die beiden Proteine in der Zelle miteinander interagieren. Zudem wurden die Zellen 5 Stunden nach der Transfektion für 18 Stunden mit dem NO-Donor SNP oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, um mögliche Auswirkungen auf die potentielle Interaktion der beiden Proteine zu analysieren.

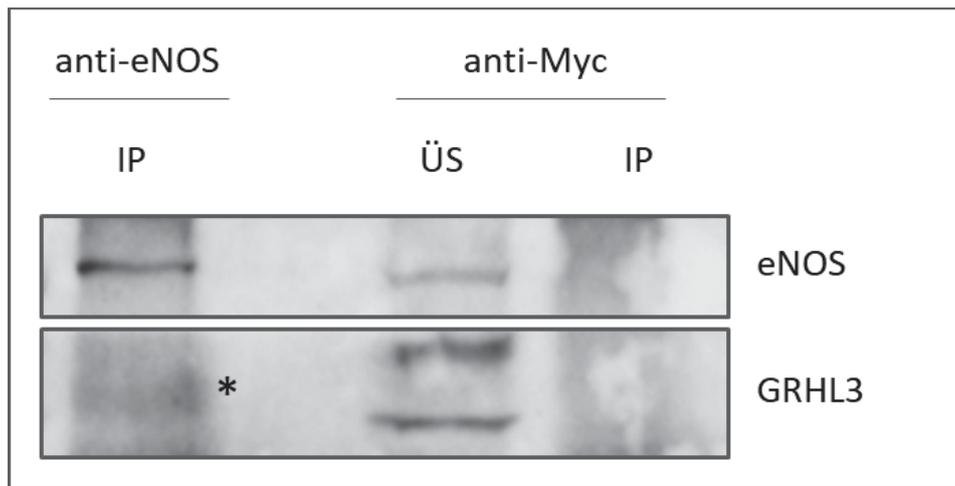


**Abbildung 3.14: GRHL3 und eNOS interagieren ex vivo.** Primäre humane Endothelzellen wurden mit Expressionsvektoren für das komplette GRHL3-Protein (*full-length*, FL) oder GRHL3-biNLS ( $\Delta$ biNLS) transfiziert. 5 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 10  $\mu$ M des NO-Donors SNP oder 200  $\mu$ M  $H_2O_2$  inkubiert und nach weiteren 18 Stunden fixiert. Die Detektion der Interaktion erfolgte mit dem „DuoLink® In Situ Detection Kit“ unter Verwendung von Antikörpern gegen das *Myc-tag* und eNOS; die Negativkontrolle enthielt keine Primärantikörper. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) und das Zytoskelett mit Phalloidin-Alexa-488 (grün) gefärbt. Die Interaktion zwischen GRHL3 und eNOS sind als Punkte (rot) dargestellt und beispielhaft mit weißen Pfeilen markiert. Merge zeigt die Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle. Der Maßstabsbalken zeigt 20  $\mu$ m an.

In Abbildung 3.14 lässt sich eine Interaktion zwischen eNOS und dem überexprimierten GRHL3-Protein erkennen, die zum Großteil im Zytoplasma stattfindet. Teilweise sind auch Signale im Bereich des Zellkerns zu erkennen. Es lässt sich allerdings nicht eindeutig bewerten, ob die Interaktion tatsächlich innerhalb des Zellkerns oder an dessen Peripherie stattfindet. Ähnliche Beobachtungen konnten für GRHL3- $\Delta$ biNLS gemacht werden, die ebenfalls mit der eNOS interagiert. Im Vergleich zum intakten GRHL3-Protein sind hier eindeutig mehr Signale zu erkennen, was auf eine verstärkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen hinweist.

Die Zugabe des NO-Donors führte zu keiner Veränderung in der Interaktion zwischen den beiden Varianten von GRHL3 und eNOS. Wurden die transfizierten Zellen hingegen mit  $H_2O_2$  behandelt, so wurden vermehrt Interaktionen zwischen GRHL3-FL und eNOS beobachtet. Auf die ohnehin stärkere Interaktion zwischen eNOS und GRHL3- $\Delta$ biNLS hatte die  $H_2O_2$ -Behandlung allerdings keinen erkennbaren Effekt.

Um die GRHL3-eNOS Interaktion mit einer gänzlich anderen Methodik zu verifizieren, wurde eine Immunpräzipitation mit einem eNOS-Antikörper aus einem Endothelzelllysat durchgeführt und GRHL3 mittels Immunoblot detektiert (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15: Co-Immunpräzipitation von eNOS und GRHL3.** eNOS wurde aus einem Lysat von unbehandelten primären humanen Endothelzellen immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit einem Myc-Antikörper durchgeführt. \*zeigt GRHL3 im eNOS-Präzipitat an. ÜS = Überstand, IP = Immunpräzipitation.

In dem Immunpräzipitat konnte GRHL3 detektiert werden, was als Hinweis auf eine Interaktion gewertet werden kann; allerdings müssen die Präzipitationsbedingungen optimiert werden, um definitive Aussagen treffen zu können. Zudem muss die potentielle Interaktion auch noch durch eine reziproke Immunpräzipitation bestätigt werden.

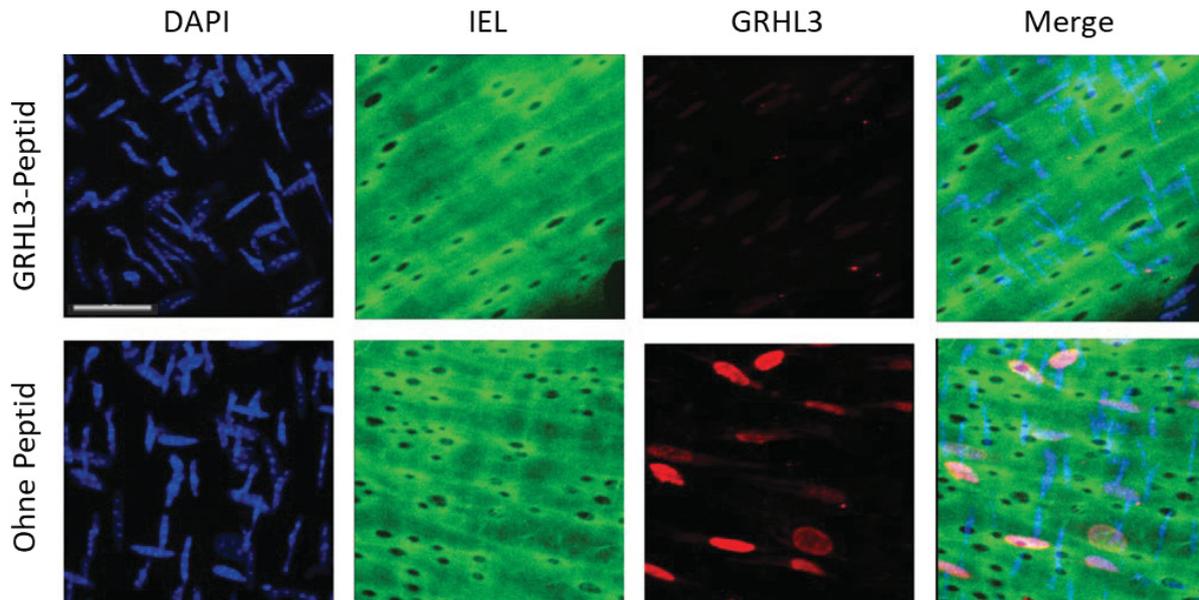
### 3.4 Expression von GRHL3 *in vivo*

In einer vorangegangenen Dissertation (Stefanie Kohlgrüber, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2016) war GRHL3 im Endothel von murinen thorakalen Aorten nachgewiesen worden. In diesen Experimenten hatte sich zudem gezeigt, dass Fütterung mit einer fettreichen Ernährung zu einer Herabregulation von GRHL3 führt. Basierend auf diesen Vorbefunden wurde während der sechsmonatigen Austauschphase im Labor von Dr. Swapnil Sonkusare am Cardiovascular Research Center der University of Virginia in Charlottesville, USA, den Fragen nachgegangen, ob GRHL3 im Endothel von murinen Arterien anderer Gefäßbetten exprimiert wird und ob es durch fettreiche Ernährung reguliert wird. Außerdem sollte mit Bezug auf die *ex vivo* Versuche die intrazelluläre Lokalisation von GRHL3 und eine mögliche Interaktion mit eNOS untersucht werden.

#### 3.4.1 Expression von GRHL3 in unterschiedlichen Gefäßbetten der Maus

Um die Expression von GRHL3 in unterschiedlichen Gefäßbetten zu untersuchen, wurden *en face* Immunfluoreszenzfärbungen von thorakaler Aorta sowie mesenterialer und pulmonaler Arterien dritter bzw. vierter Ordnung aus Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

Um auszuschließen, dass der GRHL3-Antikörper unspezifische Bindungen eingeht, wurde zunächst ein Vorversuch durchgeführt, in dem die Spezifität des GRHL3-Antikörpers in den *en face*-Färbungen durch Blockierung mit dem antigenen Peptid überprüft wurde. Dazu wurde der Antikörper mit dem bei seiner Generierung zur Immunisierung eingesetzten Peptid (GAERKMRDDERKQFRRKVKC; Aminosäuren 403-422 der humanen GRHL3-Isoform 2) 1 Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert bevor er zur *en face* Färbung verwendet wurde.

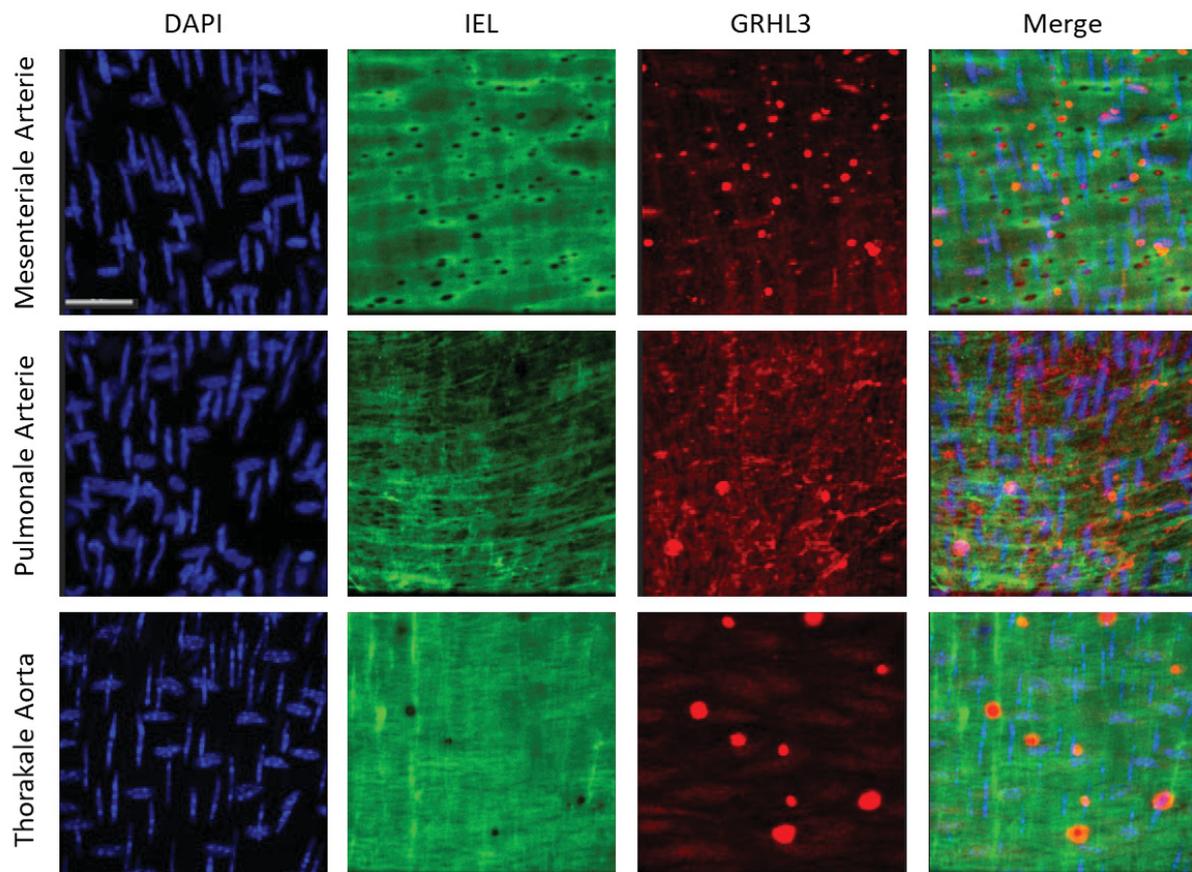


**Abbildung 3.16: Überprüfung der Spezifität des GRHL3-Antikörpers in *en face* Immunfluoreszenzfärbungen.** Frisch isolierte mesenteriale Arterien dritter Ordnung wurden entweder mit einem zuvor mit dem GRHL3-Peptid geblockten GRHL3-Antikörper (GRHL3-Peptid) oder dem ungeblockten GRHL3-Antikörper (ohne Peptid) inkubiert. Beide Proben wurden im Anschluss mit einem Alexa 568-gekoppelten Sekundärantikörper (rot) inkubiert und die Zellkerne mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die interne elastische Lamina (IEL) erscheint aufgrund von Autofluoreszenz in grün. Bedingt durch die Überlagerung der multiplen Bildebenen sind alle Zellkerne der verschiedenen Schichten der Gefäßwand in einer Ebene dargestellt; dabei sind die vertikal ausgerichteten Zellkerne die der glatten Muskelzellen, die horizontal ausgerichteten Zellkerne die der Endothelzellen. Der Maßstabsbalken zeigt 20  $\mu$ m an.

In den mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 3.16) ist jeweils das Gefäß von der Endothelzellseite betrachtet zu sehen. Unter ihr liegen mehrere Schichten glatter Muskelzellen. Die beiden Zellschichten sind durch eine Proteinmatrix, der internen elastischen Lamina (IEL), voneinander getrennt. Bei den schwarzen „Löchern“, die in der grün autofluoreszierenden IEL erkennbar sind, handelt es sich um myo-endotheliale Projektionen (MEPs). Diese MEPs sind Ausstülpungen der Plasmamembran der Endothelzellen, die sich durch die IEL hindurchziehen und damit in direkten Kontakt mit den benachbarten glatten Muskelzellen treten, was die Kommunikation zwischen beiden Zelltypen über *gap junctions* ermöglicht.

Aus der Abbildung 3.16 ist ersichtlich, dass die GRHL3-Färbung spezifisch ist, da mit dem Peptid-blockierten Antikörper keine Signale erhalten wurden, sodass der Antikörper für *en face*-Färbungen eingesetzt werden konnte.

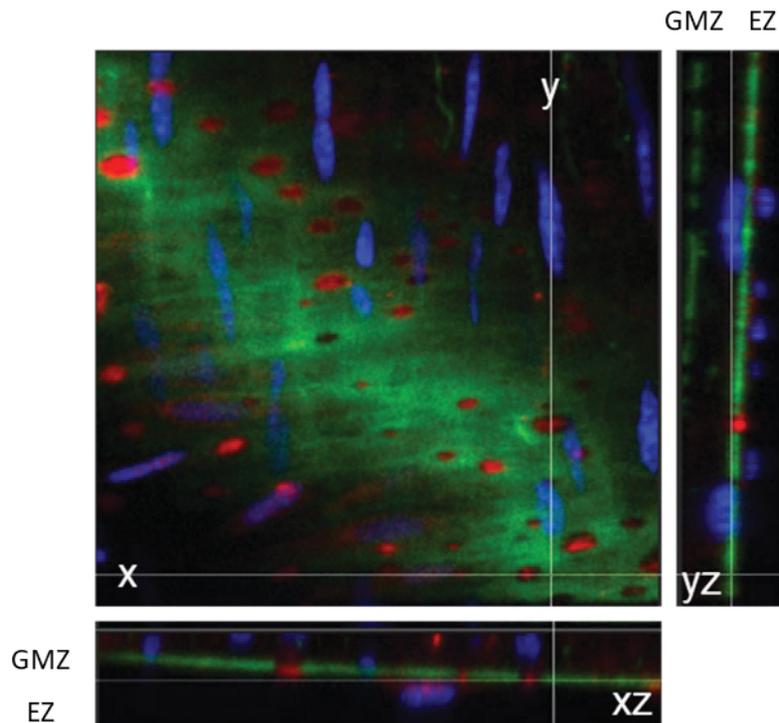
Daraufhin wurde der Antikörper eingesetzt, um zu untersuchen, ob GRHL3 im arteriellen Endothel verschiedener Gefäßbetten, nämlich Mesenterial- und Pulmonalarterien sowie thorakaler Aorta vorhanden ist.



**Abbildung 3.17: GRHL3-Expression im arteriellen Endothel verschiedener Gefäßbetten der Maus.** Gezeigt sind repräsentative *en face* GRHL3-Immunfluoreszenzfärbungen von mesenterialen Arterien dritter Ordnung und pulmonalen Arterien vierter Ordnung sowie der thorakalen Aorta. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne sind in blau (DAPI), die interne elastische Lamina (IEL) aufgrund der Autofluoreszenz in grün und die GRHL3-Färbung in rot dargestellt (GRHL3). Die schwarzen „Löcher“ in der IEL stellen die myo-endothelialen Projektionen (MEPs) dar. Der Maßstabsbalken zeigt 20 µm an.

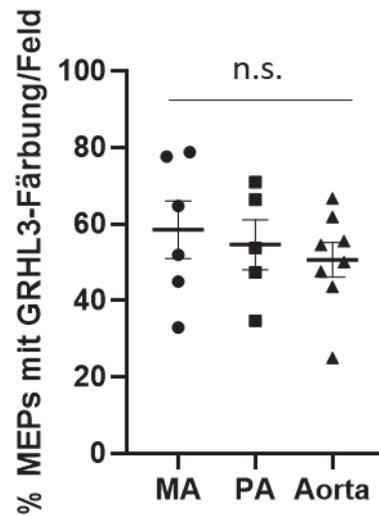
Abbildung 3.17 zeigt, dass GRHL3 in murinen arteriellen Endothelzellen aller drei Gefäßbetten exprimiert ist, aber nicht in den glatten Muskelzellen. Besonders auffällig ist die Lokalisation von GRHL3 innerhalb der Endothelzellen, wo es in den MEPs akkumuliert.

Aufgrund dieser Beobachtung wurde im Folgenden die Akkumulation von GRHL3 an den MEPs quantitativ ausgewertet. Um zu analysieren, ob es Unterschiede in der Lokalisation von GRHL3 an den MEPs in den verschiedenen Gefäßbetten gibt, wurden mithilfe der Computersoftware „Imaris x64“ (Version 9.2.1, Bitplane AG) 3D-Rekonstruktionen der Aufnahmen erstellt. Beispielhaft dafür ist in Abbildung 3.18 die 3D-Rekonstruktion eines Ausschnitts aus einer der mesenterialen Arterien gezeigt.



**Abbildung 3.18: Repräsentative 3D-Rekonstruktion einer GRHL3-*en face*-Färbung einer mesenterialen Arterie aus einer Wildtyp-Maus.** Gezeigt sind die *en face* Aufsicht sowie seitliche Aufsichten entlang der Quer- (x-Achse) bzw. Längs- (y-Achse) jeweils über die gesamte Höhe (z-Achse) der 3D-Rekonstruktion, d.h. von der Endothelzellschicht bis zur Muskelzellschicht. Die beiden Zellschichten sind durch die grün autofluoreszierende interne elastische Lamina voneinander getrennt. Bei den in der IEL sichtbaren schwarzen „Löchern“ handelt es sich um die myo-endothelialen Projektionen. GMZ = glatte Muskelzellen, EZ = Endothelzellen.

Entlang der eingezeichneten Linien wird die Fluoreszenzintensität und -verteilung im Quer- (x) bzw. Längsschnitt (y) angezeigt. Da die Bilder entlang der z-Achse (d.h. von den Endothelzellen bis zu den glatten Muskelzellen) aufgenommen wurden, erlaubt eine 3D-Rekonstruktion die Analyse der verschiedenen Ebenen des Gewebes. So ist in Abbildung 3.18 gut zu erkennen, dass nur die Zellkerne der Endothelzellen (EZ), nicht aber die der glatten Muskelzellen (GMZ) eine GRHL3-Färbung aufweisen. Auch ist die Akkumulation von GRHL3 an den MEPs, die als schwarze Unterbrechung der grünen IEL identifizierbar sind, deutlich zu sehen. Für die quantitative Auswertung wurde eine MEP als „GRHL3-positiv“ gewertet, wenn die GRHL3-Färbung in einem Radius von 5  $\mu\text{m}$  um die MEP lokalisiert war und die gemessene Fluoreszenzintensität doppelt so hoch war wie die berechnete Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz. Die Ergebnisse wurden anschließend als Prozent GRHL3-positiver MEPs pro fotografierten Ausschnitt zusammengefasst (Abbildung 3.19).



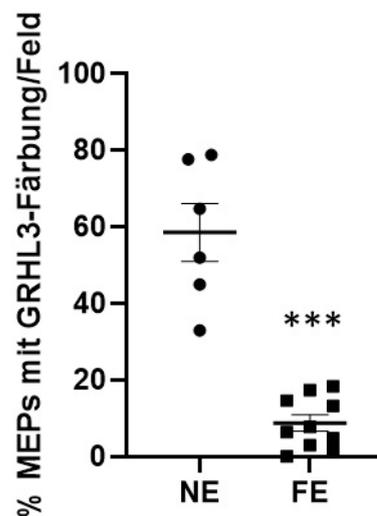
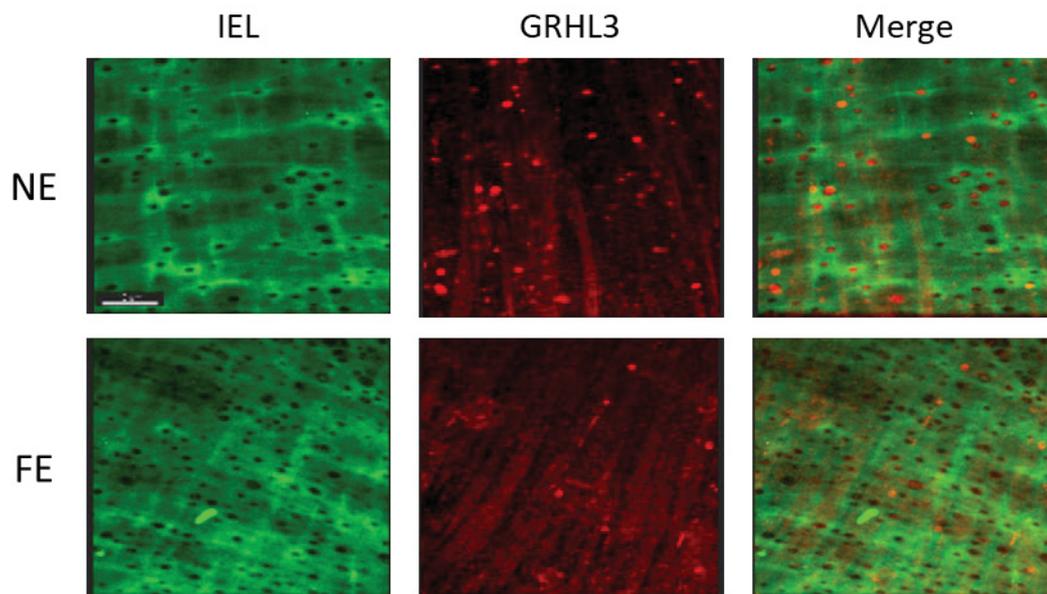
**Abbildung 3.19: GRHL3 akkumuliert gleichartig an MEPs verschiedener Gefäßbetten.** Mesenteriale und pulmonale Arterien dritter bzw. vierter Ordnung sowie thorakale Aorta wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert und *en face* Immunfluoreszenzfärbungen mit dem GRHL3-Antikörper durchgeführt. Mithilfe der Computersoftware „Imaris x64“ wurden 3D-Rekonstruktionen erstellt und in diesen die GRHL3-positiven MEPs quantifiziert. (n = 5 - 8 pro Gefäß, n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA mit post hoc Brown-Forsythe Test). MA = mesenteriale Arterie; PA = pulmonale Arterie.

Die in Abbildung 3.19 gezeigte Auswertung der einzelnen Aufnahmen legt nahe, dass GRHL3 an den MEPs aller drei Gefäßbetten etwa gleichmäßig akkumuliert.

### 3.4.2 Einfluss fettreicher Ernährung auf die Expression von GRHL3 *in vivo*

Nachdem gezeigt worden war, dass GRHL3 im Endothel der Aorta von Mäusen, die einer fettreichen Ernährung ausgesetzt waren, herunterreguliert war, sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss eine fettreiche Ernährung auf die Akkumulation von GRHL3 an den MEPs im Endothel frisch isolierter muriner mesenteriale Arterien hat.

Dafür wurden mesenteriale Arterien dritter Ordnung aus C57BL/6 Mäusen isoliert, die ab dem Alter von 6 Wochen 14 Wochen lang eine fettreiche Ernährung bekommen hatten. Als Kontrolle dienten Mäuse, die über denselben Zeitraum eine normale Ernährung erhalten hatten. In diesen Arterien wurden *en face* Immunfluoreszenzfärbungen mit dem GRHL3-Antikörper durchgeführt

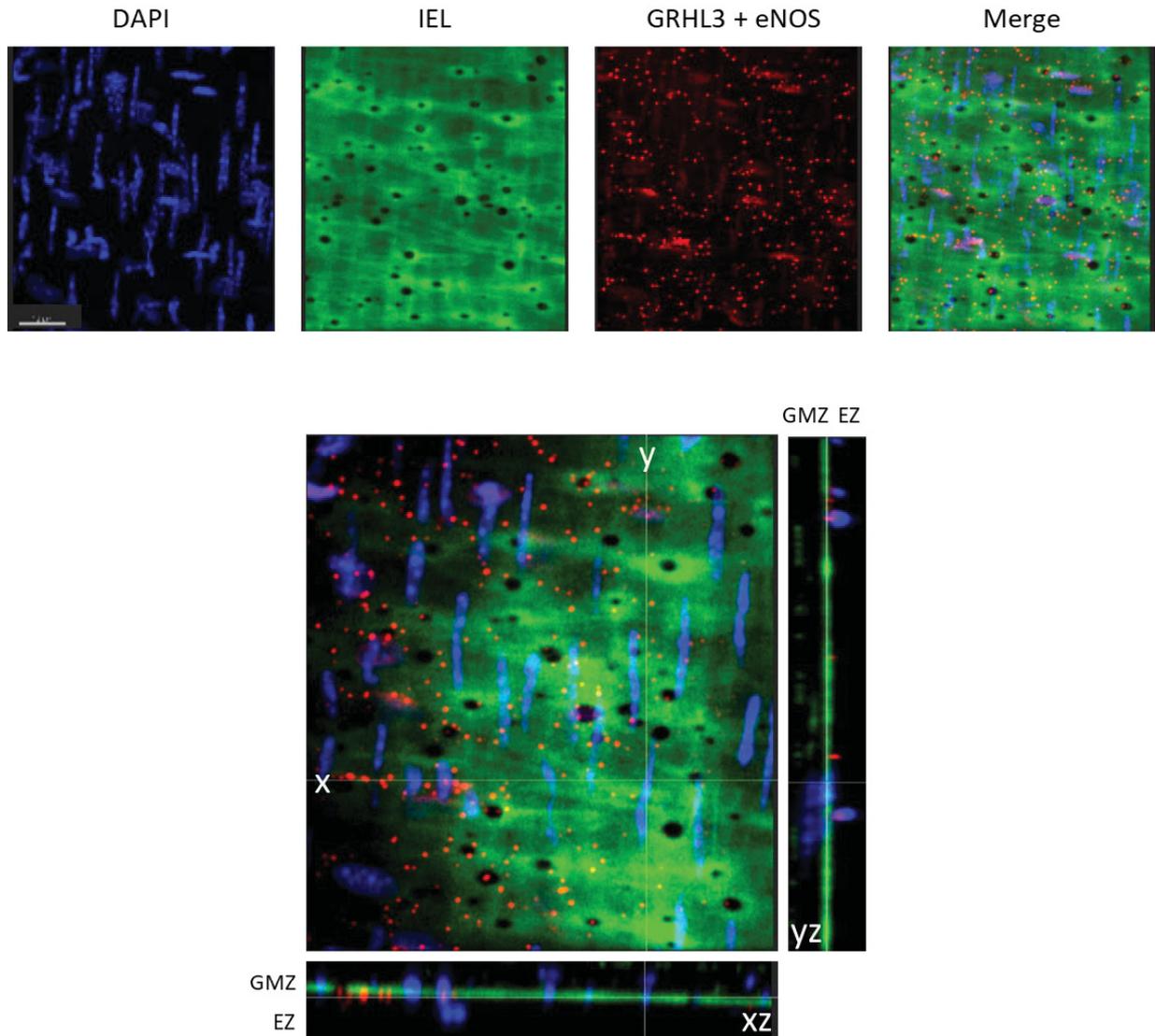


**Abbildung 3.20: Die Akkumulation von GRHL3 an MEPs mesenterialer Arterien wird durch fettreiche Ernährung herunterreguliert.** 6 Wochen alte C57BL/6 Mäuse wurden 14 Wochen lang mit einer fettreichen Ernährung (FE, 60 % Fettanteil) gefüttert. Als Kontrolle dienten gleichaltrige Tiere, die über denselben Zeitraum eine normale Ernährung (NE, 10 % Fettanteil) erhalten hatten. An den mesenterialen Arterien dritter Ordnung wurden *en face* Immunfluoreszenzfärbungen für GRHL3 durchgeführt. Oben: Repräsentative Aufnahmen. Die interne elastische Lamina (IEL) ist in grün, die GRHL3-Färbung in rot dargestellt. Unten: Quantitative Auswertung der GRHL3-positiven MEPs. Die Einzelaufnahmen sind als einzelne Punkte in der Graphik aufgeführt. Es wurden zwei Arterien von „fettreich ernährten“ Mäusen und eine Arterie von Kontrollmäusen verwendet und insgesamt 6 - 10 Felder ausgewertet. (\*\**p*<0,0002 vs. NE; Mann-Whitney U Test). Der Maßstabsbalken zeigt 20 µm an.

In Abbildung 3.20 ist zu erkennen, dass bei einer normalen Ernährung GRHL3 an den MEPs in der IEL akkumulierte. Wurden die Mäuse hingegen mit einer fettreichen Ernährung gefüttert, ging diese Akkumulation nahezu vollständig verloren. Somit lässt sich vermuten, dass eine fettreiche Ernährung einen negativen Einfluss auf die Akkumulation von GRHL3 an den MEPs hat.

#### 3.4.3 Interaktion zwischen GRHL3 und eNOS *in vivo*

Eine weitere zentrale Frage während des Aufenthaltes in den USA war, ob die *ex vivo* gezeigte Interaktion zwischen GRHL3 und eNOS auch *in vivo* nachweisbar ist. Dazu wurden mesenteriale Arterien dritter Ordnung präpariert und die beiden Proteine mittels PLA auf ihre Interaktion untersucht (Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21: eNOS und GRHL3 interagieren *in vivo*.** Eine *en face* Präparation einer mesenterialen Arterie dritter Ordnung aus einer Wildtyp-Maus wurde mit Antikörpern gegen eNOS und GRHL3 und dem „DuoLink® In situ Detection Kit“ auf Interaktion von GRHL3 und eNOS hin untersucht (rot), die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt; die autofluoreszierende interne elastische Lamina (IEL) erscheint grün. Merge zeigt die Überlagerung aller Fluoreszenzkanäle. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop gemacht. Oben: Repräsentative Aufnahme. Unten: 3D-Rekonstruktion der Aufnahmen von (oben). GMZ = glatte Muskelzellen, EZ = Endothelzellen. Der Maßstabsbalken zeigt 20 µm an.

In Abbildung 3.21 wird deutlich, dass GRHL3 und eNOS *in vivo* interagieren. Die Interaktionen sind nicht lokal begrenzt, sondern kommen an den MEPs, aber auch an anderen Stellen der Zellmembran sowie an der Kernperipherie vor.

## 4 Diskussion

Der Transkriptionsfaktor GRHL3 übernimmt zentrale Funktionen in humanen Endothelzellen, die endothelialer Dysfunktion entgegenwirken und ist somit an der Aufrechterhaltung der Integrität und Funktionalität des Endothels beteiligt. GRHL3 selbst wird vermutlich, wie viele sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren, durch posttranskriptionelle Modifikationen, Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen sowie abhängig von seiner Lokalisation im vaskulären System reguliert. Bisher wurden jedoch nur wenige dieser Mechanismen für GRHL3 entschlüsselt. In der vorliegenden Arbeit wurden potentielle Interaktionspartner verifiziert, die möglicherweise an der Regulation von GRHL3 im Endothel beteiligt sein könnten. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Oxidoreduktase Thioredoxin-1 einen positiven Einfluss auf die Transkriptionsaktivität von GRHL3 hat. Zudem konnte durch den Einsatz von Deletionsmutanten, denen das vorhergesagte zweiteilige nukleäre Lokalisationssignal fehlte, erstmalig demonstriert werden, dass GRHL3 nicht ausschließlich im Zellkern am Schutz gegen Apoptose beteiligt ist. Im Rahmen dieses Projekts durchgeführte Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese extranukleäre Aktivität durch eine Interaktion mit der endothelialen NO-Synthase im Zytoplasma vermittelt wird. In einem murinen *in vivo* Modell konnte außerdem gezeigt werden, dass GRHL3 im Endothel von pulmonalen sowie mesenterialen Arterien und der thorakalen Aorta exprimiert wird und sich besonders in sogenannten myo-endothelialen Projektionen anreichert, also auch *in vivo* außerhalb des Zellkerns vorliegt. Im selben Modell konnte außerdem in vorläufigen Experimenten gezeigt werden, dass GRHL3 und eNOS auch *in vivo* interagieren.

### 4.1 Regulation von GRHL3 durch Protein-Protein-Interaktion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen GRHL3 und NONO bzw. SFPQ in Endothelzellen mittels Co-Immunpräzipitation sowie dem immunfluoreszenzbasierten *Proximity Ligation Assay* (PLA) verifiziert.

Aus den zuvor identifizierten potentiellen Interaktionspartnern von GRHL3 waren NONO und SFPQ insofern interessant, da sie vielfältige Aufgaben im Nukleus übernehmen, die bereits ausführlich beschrieben wurden. Die beiden nah verwandten Proteine<sup>92</sup> liegen häufig als Heterodimer vor und sind beteiligt am Spleißen von prä-mRNA<sup>69, 70, 72, 93</sup> und der Regulation von Transkription<sup>71, 94-96</sup>. Außerdem übernehmen sie Reparaturfunktionen beim *Non-Homologous-End-Joining* nach DNA-Doppelstrangbrüchen<sup>86, 87</sup> und halten defekte mRNA im Nukleus zurück<sup>97</sup>.

Nach der Immunpräzipitation von GRHL3 mit dem GRHL3-Antikörper konnten sowohl NONO als auch SFPQ im Präzipitat nachgewiesen werden. Zur Validierung dieser Ergebnisse gilt für beide Proteine, dass eine reziproke Co-Immunpräzipitation durchgeführt werden sollte, bei der SFPQ bzw. NONO mit dem entsprechenden Antikörper präzipitiert werden und anschließend im Präzipitat GRHL3 detektiert wird.

Da der Antikörper gegen SFPQ nicht für eine Immunfluoreszenzfärbung geeignet war, wurden die auf einer *in situ* Detektion mit Antikörpern basierenden PLA-Experimente nur mit dem NONO-Antikörper durchgeführt. Zur Validierung der Interaktion zwischen GRHL3 und SFPQ in fixierten Zellen muss für zukünftige Experimente ein für immunfluoreszenzbasierte Methoden geeigneter SFPQ-Antikörper genutzt werden.

SFPQ ist am zweiten katalytischen Schritt beim Spleißen von prä-mRNAs beteiligt<sup>70</sup>. In höheren Eukaryoten bindet es an den Polypyrimidin-Trakt am 3'-Ende des Introns, wo die Spleißstelle bestimmt wird<sup>98</sup>. Genau wie NONO verfügt SFPQ über ein Tandem RNA-Erkennungsmotiv (*RNA-recognition motif*, RRM)<sup>92, 94, 98, 99</sup>, welches eine hohe RNA-Bindeaffinität vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass NONO mithilfe dieses RRM ebenfalls an prä-mRNA bindet, was als Indiz für eine Beteiligung am Spleißprozess gedeutet werden könnte<sup>71</sup>.

Neuere Befunde zeigen, dass NONO und SFPQ auch in alternatives Spleißen von prä-mRNAs eingreifen können. So konnte gezeigt werden, dass NONO am alternativen Spleißen der *Ephrin Typ A Rezeptor 6 (EPHA6)*-prä-mRNA beteiligt ist, wodurch eine Isoform entsteht, welche Zellproliferation und -wachstum fördert<sup>100</sup>. Des Weiteren ist NONO an der Modulation der durch zyklisches AMP-induzierten Glucocorticoidbiosynthese in der Nebennierenrinde beteiligt, indem es alternatives Spleißen der prä-mRNAs verschiedener Phosphodiesterasen-Isoformen reguliert und auch teilweise deren Stabilität beeinflusst<sup>101</sup>. Bei SFPQ konnte gezeigt werden, dass es durch das Adapterprotein Dido3, welches mit der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II interagiert, an RNA rekrutiert werden kann. Fehlt dieses Adapterprotein, etwa durch Mutation, wird die RNA-Bindeaffinität von SFPQ verringert, was dazu führt, dass vermehrt alternative Spleißstellen in den Exons frei werden und von anderen Spleißfaktoren erkannt werden können<sup>102</sup>. SFPQ kann sogar in das Spleißen seiner eigenen RNA eingreifen, indem es an eines der Introns bindet und damit dessen Ausschneiden verhindert<sup>103</sup>.

Somit ist durchaus vorstellbar, dass NONO und/oder SFPQ in das alternative Spleißen der *grhl3*-prä-mRNA, die für Isoform 1 bzw. 3 codiert, eingreifen kann und dies möglicherweise durch die Interaktion mit GRHL3 reguliert wird. Auf funktioneller Ebene ließe sich untersuchen, ob eine Modulation der Expression von NONO und/oder SFPQ in Endothelzellen das Gleichgewicht zwischen diesen GRHL3-Isoformen verschiebt und ob die Überexpression der verschiedenen GRHL3-Isoformen weitere Verschiebungen nach sich zieht. Da die aus dem alternativen Spleißen hervorgehenden Isoformen GRHL3-1 und GRHL3-3 reziproke Effekte auf Endothelzellen haben, könnte dies eine Feinregulation der Endothelzellfunktionen ermöglichen.

Neben dem Spleißen erfüllen NONO und SFPQ auch Aufgaben in der Transkriptionskontrolle. So wurde etwa gezeigt, dass NONO die Bindung sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren wie z.B. TCF3/E47, POU2F1/OTF-1 und POU2F2/OTF-2 an ihre Zielsequenzen verstärken kann; dies ist allerdings kein generelles Phänomen, da auch Transkriptionsfaktoren gefunden wurden, deren DNA-Bindeaffinität durch NONO nicht verändert wurde<sup>96</sup>. Zudem kann NONO durch

Bindung an ein Enhancer-Element in den *long terminal repeats* von murinen *intracisternal A particles* (IAP) als direkter Transkriptionsaktivator wirken <sup>71</sup>. NONO kann aber auch als Transkriptionsrepressor fungieren, was für mehrere Mitglieder der Familie der nukleären Rezeptoren, wie etwa den Thyroidhormon-, Androgen- und Progesteronrezeptor gezeigt wurde <sup>104, 105</sup>.

Im Komplex mit GRHL3 könnten NONO und/oder SFPQ damit auch die Expression GRHL3-abhängiger Gene und damit Endothelzellfunktionen regulieren. Um die Auswirkungen auf die Transkriptionsaktivität von GRHL3 zu untersuchen, könnte man die Expression von NONO und/oder SFPQ modulieren, d.h. durch Überexpression erhöhen oder mit *small interfering RNAs* herunterregulieren und ein Luziferase-Reporter gen, wie es zur Untersuchung des Einflusses von Trx-1 auf GRHL3-abhängige Transkription genutzt wurde, einsetzen. Da beobachtet wurde, dass sich die Interaktion zwischen NONO und GRHL3 bei Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verstärkt, wäre es außerdem interessant zu wissen, wie sich ein potentieller Effekt auf die Transkriptionsaktivität von GRHL3 unter Einfluss von oxidativem Stress verändert. In beiden Ansätzen könnte man die verschiedenen Isoformen von GRHL3 einsetzen, um zu untersuchen, ob diese unterschiedlich auf eine Modulation der Expression von NONO und/oder SFPQ reagieren. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Isoform 2 wäre zu erwarten, dass die Isoform 1 ähnliche Ergebnisse liefert wie Isoform 2. Wie sich die Transkriptionsaktivität von Isoform 3 in Abhängigkeit von NONO und/oder SFPQ verändern würde, ist hingegen offen. Inwieweit NONO und SFPQ sich auf Funktionen von Endothelzellen, die von GRHL3 reguliert werden, auswirken, ließe sich durch Expression der verschiedenen GRHL3-Isoformen und gleichzeitiger Modulation der Expression von NONO und/oder SFPQ untersuchen. In dieser Hinsicht würden sich Endothelzellmigration und -apoptose sowie Veränderungen der aktivierenden Phosphorylierung an Serin 1177 der eNOS als messbare Parameter anbieten, da für diese bereits ein Einfluss von GRHL3 gezeigt worden war.

#### **4.2 Regulation der Transkriptionsaktivität von GRHL3 durch Thioredoxin-1**

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen Trx-1 und GRHL3-Transkriptionsfaktoraktivität hergestellt. Experimente mit einem GRHL3-abhängigen Luziferase-Reporter gen haben gezeigt, dass bei Co-Expression von GRHL3 und Trx-1 die Transkriptionsaktivierung durch GRHL3 signifikant erhöht wird, was darauf hindeutet, dass Trx-1 einen positiven Einfluss auf die Aktivität von GRHL3 hat.

Trx-1 kann durch Reduktion von Transkriptionsfaktoren Einfluss auf deren Aktivität nehmen. Für diese Art der Regulation ist eine direkte Interaktion mit dem Zielprotein erforderlich. Um der Frage nachzugehen, ob Trx-1 ebenfalls an GRHL3 binden und somit dessen Transkriptionsaktivität regulieren kann, könnte eine Interaktion der beiden Proteine mittels Co-Immunpräzipitation und PLA untersucht werden.

In einem weiteren Schritt könnte man untersuchen, ob die verstärkende Wirkung von Trx-1 auf die Transkriptionsaktivität von GRHL3 auf die Redoxaktivität von Trx-1

zurückzuführen ist. Dazu könnte in Analogie zu den bereits durchgeführten Experimenten eine Co-Transfektion von GRHL3 und des GRHL3-abhängigen Luziferase-Reporters mit einer Trx-1-Substitutionsmutante genutzt werden, in der die für die Redoxaktivität essentiellen Cysteine an Position 32 und 35 im aktiven Zentrum des humanen Proteins durch strukturell ähnliche, aber redoxinaktive Serine ausgetauscht sind. Sollte eine Co-Transfektion mit der redoxinaktiven Trx-1-Substitutionsmutante keine Erhöhung der Transkriptionsaktivität von GRHL3 bewirken können, läge der Gedanke nahe, dass auch Cysteine innerhalb von GRHL3 beteiligt sein könnten. Entsprechend könnte man eine GRHL3-Substitutionsmutante herstellen, bei der in der DNA-Bindedomäne Cysteine gegen nicht redoxensitive Aminosäuren ausgetauscht werden und auch diese mit Trx-1 und dem Luziferase-Reporter

co-exprimieren. Ein Vergleich der humanen GRHL Proteine zeigt, dass sich im Bereich der postulierten DNA-Bindedomänen von GRHL1, GRHL2 und GRHL3 <sup>106</sup> drei in allen diesen Proteinen konservierte Cysteine befinden. Hierbei handelt es sich um die Cysteine an den Positionen 356, 394 und 400 in GRHL3. Diese Konservierung kann als erster Hinweis auf eine essentielle Funktion dienen, was dadurch unterstützt wird, dass einer dieser Cysteinreste in GRHL1 in Kontakt mit DNA tritt <sup>107</sup>.

Um nachzuweisen, wie sich die genannten Mutationen sowohl in Trx-1 als auch in GRHL3 auf die physikalische Interaktion der beiden Proteine auswirken, müssten auch für diese Mutanten Co-Immunpräzipitationen und PLAs durchgeführt werden.

#### 4.3 Nukleäre Lokalisation von GRHL3

Dieser Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung des nukleären Lokalisationssignals und der Frage, ob GRHL3 auch außerhalb des Zellkerns essentielle Funktionen übernimmt.

Basierend auf der Vorhersage eines zweiteiligen Kernlokalisierungssignals (*bipartite* NLS) direkt N-terminal zu der Dimerisierungsdomäne von GRHL3 waren mehrere Mutanten mit Deletionen in diesem Bereich generiert worden. In einer der Mutanten war exakt dieser Bereich deletiert worden (GRHL3- $\Delta$ biNLS), in einer zweiten ein Abschnitt direkt N-Terminal hierzu (GRHL3- $\Delta$ C4), die dritte Deletionsmutante stellte eine kombinierte Deletion beider Bereiche dar (GRHL3- $\Delta$ C5). In dieser Arbeit wurden diese Deletionsmutanten zunächst auf ihre Kernlokalisation in HEK293T-Zellen untersucht. Immunfluoreszenzfärbungen sowie eine biochemische Zellfraktionierung ergaben, dass alle GRHL3-Varianten zum Teil im Zytoplasma zurückgehalten werden, partiell aber auch noch in den Zellkern translozieren. Eine Analyse der subzellulären Lokalisation von GRHL3- $\Delta$ biNLS in primären humanen Endothelzellen hingegen offenbarte eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation dieser Mutante. Diese konträren Beobachtungen deuten auf einen Unterschied im Kernimport in den beiden Zelltypen hin.

In Eukaryonten stellt die Kernmembran eine Barriere für die Diffusion von Makromolekülen dar, deshalb erfolgt der Transport größerer Proteine vom Zytoplasma

in den Nukleus über spezialisierte Strukturen, die Kernporenkomplexe <sup>108</sup>. Während diese Kernporenkomplexe für kleine Moleküle und Proteine, Metabolite und Ionen frei permeabel sind, können Proteine ab ca. 40 kDa nur mithilfe spezieller Transportproteine, den  $\beta$ -Karyopherinen, aktiv durch die Kernporenkomplexe im- und exportiert werden <sup>109</sup>.  $\beta$ -Karyopherine vermitteln direkt oder mithilfe von Adapterproteinen den Import von Proteinen, die die maximale Größe für freie Diffusion durch die Kernporenkomplexe überschreiten, indem sie an das NLS der Zielproteine binden <sup>109, 110</sup>. Von den 19 bekannten menschlichen  $\beta$ -Karyopherinen sind 11 am Kernimport NLS-tragender Proteine beteiligt <sup>110</sup>.

Bis heute ist nicht bekannt, über welchen Mechanismus GRHL3 in den Zellkern transportiert wird. Da aber auch andere Proteine mit zweiteiligem NLS, z. B. Nucleoplasmin <sup>109, 111</sup> und *Extracellular Signal-Regulated Kinase 5* (ERK5) <sup>112</sup>, über  $\beta$ -Karyopherine in den Kern importiert werden, ist die Vermutung zulässig, dass dies auch für GRHL3 gilt. Es ist denkbar, dass in HEK293T-Zellen und primären humanen Endothelzellen unterschiedliche  $\beta$ -Karyopherine exprimiert werden, was die beobachteten Unterschiede im Kernimport von GRHL3 erklären könnte. Teilweise spielen auch Phosphorylierungen eine wichtige Rolle beim Kernimport, da sie die Bindeaffinität zu den entsprechenden Importproteinen oder Adapterproteinen erhöhen oder verringern oder eine Interaktion mit diesen erst ermöglichen können <sup>113</sup>. So führt eine aktivierende Phosphorylierung in der N-terminalen Hälfte von ERK5 durch *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)-Kinase 5 (MEK5) zu einer Konformationsänderung, wodurch das zweiteilige NLS freigelegt wird und ERK5 schließlich in den Kern importiert werden kann <sup>112</sup>. Phosphorylierungen von GRHL3 sind bisher nur unzureichend untersucht, deshalb ist nicht klar, ob diese unterschiedlich in HEK293T-Zellen und Endothelzellen sind und ob sie einen Einfluss auf den Kernimport haben.

Studien zur differentiellen Expression der verschiedenen  $\beta$ -Karyopherine in den beiden untersuchten Zelltypen und Interaktionsstudien ausgesuchter  $\beta$ -Karyopherine mit GRHL3 könnten zur Klärung der Frage nach den Ursachen des unterschiedlichen Kernimports beitragen. Um eine potentielle Beteiligung von Phosphorylierungen am Kernimport aufzuklären, müssten zunächst detaillierte Untersuchungen zu dieser post-translationalen Modifikation von GRHL3, die wie im Fall von ERK5 nicht unbedingt im NLS *per se* liegen müsste, durchgeführt werden. Basierend darauf könnten dann nicht-phosphorylierbare bzw. phosphomimetische Mutanten von GRHL3 bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation und somit dem Import in den Zellkern untersucht werden. Dies könnte langfristig auch dazu beitragen, Signalwege zu identifizieren, die an der Regulation der intrazellulären Verteilung von GRHL3 beteiligt sind.

#### 4.4 Extranukleäre Funktionen von GRHL3

Nachdem gezeigt worden war, dass die GRHL3-Mutante mit der Deletion des zweiteiligen NLS in Endothelzellen größtenteils im Zytoplasma zurückgehalten wird, wurde untersucht, ob dieses nicht-nukleäre Protein noch Funktionen von GRHL3 hat.

Dafür wurde zunächst analysiert, ob die Retention von GRHL3 im Zytoplasma Auswirkungen auf die antiapoptotische Funktion des Proteins hat. Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptose-Induktionsweg ist nicht abhängig von Genexpression und werden durch Signalprozesse außerhalb des Zellkerns initiiert <sup>114</sup>. Extranukleäres GRHL3 ist zwar nicht mehr in der Lage, Transkription zu aktivieren, könnte aber durchaus in diese Signalwege eingreifen. Endothelzellapoptose ist von physiologischer Bedeutung, wie z. B. bei der Entstehung des Kapillarenlumens in Nierenglomeruli <sup>115</sup> oder bei postnatalen vaskulären *Remodeling*-Prozessen <sup>116</sup>. Darüber hinaus hat sie pathophysiologische Relevanz in vielen kardiovaskulären Erkrankungen oder Krankheitsbildern, die Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System haben, etwa bei Atherosklerose <sup>117</sup>, Herzinsuffizienz <sup>118</sup> und Typ II Diabetes <sup>119, 120</sup>.

In diesem Kontext wurde gezeigt, dass die Deletionsmutante GRHL3- $\Delta$ biNLS die Aktivierung von Caspase 3 in primären humanen Endothelzellen inhibieren kann. Caspase 3 ist eine Effektorcaspase, die als inaktive Pro-Form gebildet wird und nach internen oder externen Apoptose-induzierenden Stimuli mittels proteolytischer Spaltung aktiviert wird <sup>5, 121</sup>. Die Menge an proteolytisch gespaltener und damit aktivierter Caspase 3 kann somit als direktes Maß für die Einleitung von Apoptose dienen. Es stellte sich heraus, dass die extranukleäre GRHL3-Variante wie das *full-length* Protein in der Lage war, Apoptose in Endothelzellen zu inhibieren. Tatsächlich war der antiapoptotische Effekt sogar stärker als der des intakten Proteins. Dieser Effekt kann nicht durch die Aktivierung von Zielgenen, deren Genprodukte regulierend in die Apoptoseinduktion eingreifen könnten, erklärt werden, da für GRHL3- $\Delta$ biNLS neben seiner Lokalisation außerhalb des Zellkerns auch nachgewiesen worden war, dass dieses Protein nicht in der Lage war, die Transkription eines GRHL3-abhängigen Reportergens zu aktivieren. Deshalb entwickelte sich die Hypothese, dass GRHL3 Endothelzellapoptose durch extranukleäre Mechanismen regulieren kann. Dies könnte auch die ausgeprägte Apoptoseinhibition durch die extranukleäre GRHL3-Variante erklären, da in diesem Fall das gesamte translatierte Protein im Zytoplasma vorliegt.

Als mögliche Erklärung könnte eine erhöhte NO-Produktion dienen. NO spielt eine wichtige Rolle beim Schutz vor Endothelzellapoptose, etwa indem es Caspase 3 durch S-Nitrosierung an Cystein 163 der p17-Untereinheit inhibiert <sup>118</sup>. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die antiapoptotische Wirkung von GRHL3 in Endothelzellen durch die Zugabe eines eNOS-Inhibitors blockiert werden kann <sup>62</sup>, was darauf hinweist, dass dieser Effekt NO-abhängig ist. Zudem führte die Überexpression von GRHL3 zu einer verstärkten Phosphorylierung von eNOS an Serin 1177, einem Surrogatmarker für die Aktivität des Enzyms <sup>62</sup>. Dies wurde damit erklärt, dass GRHL3 die Akt2 Mengen erhöht, was dann über Phosphorylierung von Akt1 an Serin 473 und der damit verbundenen Aktivierung dieser Kinase die Phosphorylierung an Serin 1177 der eNOS verstärkt <sup>66, 67</sup>.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass extranukleäres GRHL3 auch eine Interaktion mit eNOS eingehen kann. Mittels PLA konnte gezeigt

werden, dass sich GRHL3 im Zytoplasma in enger räumlicher Nähe zu eNOS befindet und so die Möglichkeit zu einer Interaktion besteht. Dieser Effekt war bei der NLS-defizienten GRHL3-Mutante stärker ausgeprägt als bei dem intakten Protein, was wahrscheinlich, wie zuvor ausgeführt, durch die exklusive zytoplasmatische Lokalisation bedingt ist. Allerdings sind die beobachteten Signale beim PLA relativ schwach. Eine Erklärung hierfür könnte in dem verwendeten *ex vivo* Zellkultursystem liegen, bei dem mit einer Endothelzell-Monokultur gearbeitet wurde. In den *in vivo* Immunfluoreszenzfärbungen muriner arterieller Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass GRHL3 verstärkt an myo-endothelialen Projektionen (MEPs), Ausstülpungen der endothelialen Plasmamembran als Kontaktstellen zwischen Endothel und den angrenzenden glatten Muskelzellen, akkumuliert. Es ist denkbar, dass die Ausbildung dieser Strukturen für eine intrazelluläre Umverteilung von GRHL3 aus dem Zellkern ins Zytoplasma benötigt wird. Um dies experimentell zu simulieren und damit auch *ex vivo* die physiologisch relevante *in vivo* Situation nachzustellen, könnte eine Co-Kultur aus Endothel- und glatten Muskelzellen eingesetzt werden, in der es, im Gegensatz zu einer reinen Monokultur aus Endothelzellen, zur Ausbildung von MEPs kommt. Dafür werden Endothelzellen und glatte Muskelzellen auf gegenüberliegenden Seiten eines Filters kultiviert, wobei sich MEPs ausbilden können<sup>122</sup>. Diese MEP-Fraktion ließe sich isolieren und somit die mögliche Akkumulation von GRHL3 auch in humanen MEPs nachweisen. Nichtsdestotrotz deuten die Befunde dieser Arbeit darauf hin, dass GRHL3 in Endothelzellen in einem Komplex mit eNOS vorliegt. Dies könnte deren aktivierende Phosphorylierung erleichtern und somit die NO-Produktion erhöhen, was zum Schutz der Endothelzellen vor Apoptose beitragen würde.

Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste zunächst nachgewiesen werden, ob eine exogene Expression von GRHL3- $\Delta$ biNLS ähnlich wie bei dem *full-length* Protein zu einer erhöhten eNOS-Phosphorylierung führt. Zusätzlich könnten die zellulären NO-Level gemessen werden. Ein direkter Nachweis für die NO-Abhängigkeit der antiapoptotischen Wirkung von extranukleärem GRHL3 ließe sich durch Einsatz eines eNOS-Inhibitors nach Überexpression von GRHL3- $\Delta$ biNLS erbringen.

Ein anderes Protein, das mit eNOS in einem Komplex vorliegt, ist das ubiquitär exprimierte *Heat Shock Protein 90* (HSP90). Durch Einfluss von Agonisten, welche die NO-Produktion stimulieren, etwa vaskuläre Wachstumsfaktoren oder mechanischer Scherstress, wird HSP90 in einen Komplex mit eNOS rekrutiert, was wiederum die Aktivierung von eNOS erhöht<sup>123</sup>. Darauf basierend könnte z. B. mit dem PLA untersucht werden, ob auch GRHL3 mit HSP90 interagiert oder ob alle drei Proteine in einem Komplex vorliegen, was mit einer Co-Immunpräzipitation analysiert werden könnte. Dabei wäre jeweils interessant, ob die Interaktion(en) mit der exklusiv zytoplasmatischen GRHL3-Mutante ausgeprägter sind als die mit dem intakten Protein.

Unter den Transkriptionsfaktoren, für die ebenfalls extranukleäre Funktionen beschrieben wurden, findet sich das Tumorsuppressorprotein p53. Anders als GRHL3 übernimmt p53 allerdings proapoptotische Funktionen, welche es auf zweierlei Weise

erfüllen kann. Als Transkriptionsfaktor aktiviert es bei zellulärem Stress, etwa DNA-Schäden und -Mutationen, Hypoxie oder oxidativen Stress, die Transkription von Genen, die für Zellzyklusarrest (z. B. p21) und Apoptoseinduktion (z. B. Bcl2-Proteine) <sup>33</sup> codieren. Aber auch außerhalb des Zellkerns ist p53 in der Lage, Apoptose in Zellen zu induzieren. Letzteres haben im Jahr 1995 Haupt *et al.* zeigen können, da eine mutierte Variante von p53, bei der die Transaktivierungsdomäne vollständig und die DNA-Bindedomäne beinahe vollständig deletiert waren, weiterhin Apoptose induzieren konnte <sup>34</sup>. Dies wurde durch weitere Studien bestätigt, bei denen eine Reihe von Transaktivierungs-defizienten p53 Mutanten unabhängig von der Transkriptionsaktivierung von Zielgenen Apoptose auslösen konnten <sup>35</sup>. Diese Transaktivierungs-unabhängige Induktion von Apoptose kann durch zwei Mechanismen erklärt werden. Zum einen trägt p53 zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*, MOMP) bei, was zum Austreten von Cytochrom-c führt und Apoptose auslöst <sup>33</sup>. Zum anderen inhibiert p53 Autophagie, einen Vorgang, bei der die Zelle eigene, geschädigte Zellbestandteile vernichtet und somit unschädlich macht <sup>33</sup>, wodurch Apoptose vermieden werden kann.

Zudem wäre von Interesse, ob extranukleäres GRHL3, möglicherweise auch durch Interaktion mit eNOS, noch weitere, für GRHL3 beschriebene Funktionen hat. In diesem Kontext wäre es interessant, den promigratorischen Effekt zu untersuchen, da Endothelzellmigration ebenfalls NO-abhängig ist <sup>124</sup>. Zur experimentellen Umsetzung könnten nach Überexpression von GRHL3 und der extranukleären Mutante in Endothelzellen Migrations-Assays, wie ein 3D *Sprouting Assay* oder ein *Scratch-Wound-Assay*, durchgeführt werden. Auch hier ließe sich der Nachweis einer NO-Abhängigkeit durch gleichzeitige Behandlung mit einem eNOS-Inhibitor analysieren. Derartige Studien könnten dazu beitragen, genauer zwischen transkriptionsgebundenen und nichtnukleären Funktionen von GRHL3 im Endothel zu differenzieren.

#### 4.5 Expression von GRHL3 *in vivo*

Frühere Studien hatten gezeigt, dass GRHL3 auch *in vivo* im Endothel der Mausaorta vorhanden ist, allerdings wurde hierbei die subzelluläre Lokalisation nicht analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob GRHL3 auch im arteriellen Endothel anderer Gefäßbetten exprimiert wird, wie die subzelluläre Verteilung ist und ob es - wie in primären humanen Endothelzellen - zu einer Interaktion mit eNOS kommt.

*En face* Immunfärbungen frisch isolierter Gefäße zeigten, dass GRHL3 nicht nur im Endothel der thorakalen Aorta, sondern auch im Endothel blutdruckregulierender mesenterialer und pulmonaler Arterien dritter bzw. vierter Ordnung exprimiert wird. Dabei war in allen drei untersuchten Gefäßbetten neben der nukleären Lokalisation von GRHL3 auch eine ausgeprägte Akkumulation an sogenannten myo-endothelialen Projektionen (MEPs), Ausstülpungen der endothelialen Plasmamembran als

Kontaktstellen zwischen Endothel und den angrenzenden glatten Muskelzellen, zu beobachten. Dass GRHL3 im arteriellen Endothel verschiedener Gefäßbetten gesunder, wildtypische Mäuse intra- und extranukleär vorliegt, bestätigte damit die *ex vivo* Ergebnissen in primären humanen Endothelzellen in einem murinen *in vivo* Modell. Aufbauend auf dieser Beobachtung und der Tatsache, dass eNOS ebenfalls an MEPs pulmonaler Arterien vierter Ordnung aktiv ist <sup>125-127</sup>, wurde eine potentielle Interaktion von GRHL3 mit eNOS analysiert.

Die Aufgabe von eNOS an MEPs im pulmonalen arteriellen Endothel ist die Kooperation mit TRPV4-Ionenkanälen, die in den MEPs von Endothelzellen sitzen und Ca<sup>2+</sup>-induzierte Vasodilatation vermitteln. Die eNOS-Aktivierung führt zu erhöhter NO-Produktion und Diffusion von NO in angrenzende glatte Muskelzellen. Dort aktiviert NO den Guanylyl-Cyclase (GC)-Protein Kinase G (PKG) Signalweg, was wiederum eine Relaxation der Muskelzellen zur Folge hat <sup>126</sup>.

Erste PLAs an *en face* Präparationen mesenterialer Arterien dritter Ordnung zeigten deutlich, dass es zu Interaktionen zwischen GRHL3 und eNOS kommt und dass diese nicht lokal begrenzt sind, sondern sowohl an den MEPs als auch in anderen Teilen des Zytosols und an der Kernperipherie vorkommen. Demnach könnte GRHL3 im Zusammenspiel mit eNOS vielfältige Aufgaben übernehmen. Angesichts der Funktion der eNOS an den MEPs in der Ca<sup>2+</sup>-induzierten Vasodilatation wäre es denkbar, dass eine Interaktion mit GRHL3 an den MEPs die Rekrutierung von Kinasen unterstützt, die die aktivierende Phosphorylierung an Serin 1179 der murinen eNOS vermitteln und so für eine gesteigerte NO-Produktion sorgen. Im Zusammenhang mit der Aufgabe der eNOS an den MEPs könnte GRHL3 also indirekt an der Regulation der Ca<sup>2+</sup>-induzierten Vasodilatation beteiligt sein. In anderen Teilen des Zytosols kann eine Kooperation mit eNOS und eine damit einhergehende Steigerung der NO-Produktion möglicherweise die Apoptoseinhibition verstärken. Es ist also denkbar, dass die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation eines Komplexes aus den beiden und möglicherweise weiteren Proteinen zu unterschiedlichen Effekten beiträgt.

Für eine Beteiligung von GRHL3 an der Regulation der eNOS-unterstützten Vasodilatation spricht auch die Beobachtung, dass die GRHL3-Expression im arteriellen Endothel von Mäusen, die mit einer hochkalorischen, sehr fetthaltigen Ernährung gefüttert worden waren, im Vergleich zu normalkalorisch gefütterten Mäusen deutlich zurückging. Dies deckt sich auch mit früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in denen gezeigt wurde, dass GRHL3-Expression im Endothel von Gewebeschnitten der Aorta von Mäusen, die eine fettreiche Ernährung erhalten hatten, deutlich zurückging (Dissertation Kohlgrüber, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2016). Zudem sind diese Beobachtungen deckungsgleich mit der Tatsache, dass die eNOS-Menge und NO-Produktion in Endothelzellen, die mit hohen Dosen von LDL bzw. oxidiertem LDL behandelt worden waren, ebenfalls signifikant reduziert waren <sup>128, 129</sup>. Auch im murinen Modell führt die oben genannte fettreiche Ernährung zu einer Reduktion der eNOS-Menge und damit einhergehend zu einer beeinträchtigten Vasodilatation <sup>130</sup>.

Langfristig könnte zur Untersuchung der verschiedenen oben aufgeworfenen Fragestellungen *in vivo* ein Mausmodell mit einem endothelspezifischen GRHL3-knockout genutzt werden. Die hierfür notwendigen Mäuse mit einem konditionalen GRHL3-Allel existieren bereits. In diesem ist der Bereich auf Chromosom 4, der die Exons 2 bis 4 des *ghrl3*-Gens von zwei *loxP sites* flankiert, sodass eine *Cre*-vermittelte Deletion zum Verlust des GRHL3-Proteins führt<sup>131</sup>. Durch Verpaarung mit entsprechenden, sogenannten *Cre-Deleter* Mäusen könnten damit Mäuse mit GRHL3-defizienten Endothelzellen erzeugt werden. Da einige dieser Mäuse auch eine Tamoxifen-induzierbare *Cre*-Variante exprimieren<sup>132</sup>, wäre zudem eine gezielte Induktion der Deletion zu einem definierten Zeitpunkt möglich. Mithilfe eines solchen Modells könnten die physiologischen Funktionen von GRHL3 sowohl bezüglich Endothelintegrität als auch Vasodilatation eingehender *in vivo* untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Das vaskuläre Endothel stellt die Barriere zwischen Blutstrom und umgebendem Gewebe dar und spielt darüber hinaus eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus und der Hämostase. Da endotheliale Dysfunktion zur Entwicklung vieler kardiovaskulärer Erkrankungen beiträgt, ist es entscheidend, die Mechanismen zu verstehen, die Endothelfunktionen aufrechterhalten. Der Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 3 (GRHL3) spielt hierbei eine zentrale Rolle, indem er die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid durch Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) erhöht, Endothelzellmigration fördert und Endothelzellen vor Apoptose schützt. Ziel dieser Arbeit war es, Mechanismen zu untersuchen, über die GRHL3 selbst reguliert wird und wie GRHL3 in Endothelfunktionen eingreift.

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird auf vielen Ebenen reguliert, darunter auch über Protein-Protein-Interaktionen, ihren Redoxstatus sowie die intrazelluläre Lokalisation. Ich konnte verifizieren, dass GRHL3 mit *Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein* (NONO) und *Splicing Factor, Proline- and Glutamine-Rich* (SFPQ), zwei Proteinen, die an Transkriptionsregulation und am Spleißen beteiligt sind, interagiert. Daher ist es möglich, dass diese Proteine die transkriptionelle Aktivität von GRHL3 modulieren und möglicherweise auch in das alternative Spleißen von GRHL3 selbst eingreifen. Zudem wurde erstmals gezeigt, dass eine der wichtigsten Oxidoreduktasen im Endothel, Thioredoxin-1, GRHL3-abhängige Transkription verstärken kann, was eine Regulation von GRHL3 auch über seinen Redoxstatus nahelegt.

Im Rahmen der Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen wurde ein zweiteiliges, nukleäres Lokalisationssignal in GRHL3 identifiziert, dessen Deletion zu einer exklusiv zytoplasmatischen Lokalisation in primären humanen Endothelzellen führte. Erwartungsgemäß war diese Deletionsmutante nicht mehr in der Lage, GRHL3-abhängige Transkription zu aktivieren. Erstaunlicherweise konnte sie dennoch Endothelzellapoptose inhibieren. Diese extranukleären Funktion basiert wahrscheinlich zum Teil auf einer Interaktion mit eNOS. In Studien an murinen Mesenterial- und Pulmonalarterien sowie der thorakalen Aorta konnte ich nachweisen, dass GRHL3 in vivo im Endothel unterschiedlicher Gefäßbetten exprimiert ist. Hier akkumuliert es verstärkt außerhalb des Zellkerns an Ausstülpungen der Plasmamembran, sogenannten myo-endothelialen Projektionen, wo es mit eNOS colokalisiert ist und interagiert, was die ex vivo Daten eindrucksvoll bestätigte. Zudem führte eine fettreiche Ernährung, ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, zu einer dramatischen Abnahme von GRHL3 im Endothel.

Zukünftige Arbeiten müssen zeigen, in welcher Weise GRHL3 über die Interaktionen mit NONO, SFPQ und Trx-1 reguliert wird und wie die Interaktion mit eNOS Einfluss auf weitere Parameter von Endothelfunktionen nimmt. Zudem ließe sich der Einfluss von GRHL3 auf Endothelfunktionen in vivo durch Verwendung von Mäusen mit einer endothelspezifischen Deletion von GRHL3 untersuchen.

## Summary

The vascular endothelium constitutes the barrier between the blood stream and surrounding tissue, but also plays a critical role in the regulation of vascular tone and hemostasis. Since endothelial dysfunction contributes to the development of all major cardiovascular diseases, it is crucial to understand the mechanisms that maintain endothelial functionality. In that respect, the transcription factor Grainyhead-like 3 (GRHL3) plays a key role enhancing nitric oxide (NO)-bioavailability through the activation of endothelial NO synthase (eNOS), promoting endothelial cell migration as well as inhibiting endothelial cell apoptosis. The aim of this thesis was to analyze mechanisms through which GRHL3 is regulated and how it affects endothelial functions.

Transcription factor activity is regulated at multiple levels, including protein-protein interactions, their redox status and intracellular localization. I could verify the interactions of GRHL3 with the Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein (NONO) and Splicing Factor, Proline- and Glutamine-Rich (SFPQ), two proteins which participate in the regulation of transcription and splicing. Therefore, it is conceivable that these proteins modulate the transcriptional activity of GRHL3 and possibly also affect alternative splicing of GRHL3 itself. In addition, I could show for the first time that one of the major oxidoreductases in the endothelium, Thioredoxin-1, enhances GRHL3-dependent transcriptional activation, which implies regulation of GRHL3 via its redox status.

The analysis of structure-function relationships revealed a bipartite nuclear localization signal in GRHL3 whose deletion led to exclusively cytoplasmic localization in primary human endothelial cells. As expected, this deletion mutant was incapable of activating GRHL3-dependent transcription. Surprisingly, it could still inhibit endothelial cell apoptosis. Most likely, this extra-nuclear function is based – at least in part – on an interaction with eNOS. In studies with murine mesenteric and pulmonary resistance arteries as well as the thoracic aorta, I could show that GRHL3 is expressed *in vivo* in the endothelium of different vascular beds. Here, it accumulates outside the nucleus in protrusions of the plasma membrane, so-called myoendothelial projections, where it co-localizes and interacts with eNOS, impressively corroborating the *ex vivo* data. Moreover, a high-fat diet, a risk factor for cardiovascular diseases, led to a dramatic reduction of GRHL3 levels in the endothelium.

Future studies will have to reveal how GRHL3 is regulated through the interactions with NONO, SFPQ and Trx-1 and how the interaction with eNOS affects other parameters of endothelial functionality. In addition, the impact of GRHL3 on endothelial functions *in vivo* could be analyzed using mice with and endothelial-specific deletion of GRHL3.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Heiss EH and Dirsch VM. Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification. *Curr Pharm Des.* 2014;20:3503-13.
2. Zylka-Menhorn V. Atherosklerose: Das Endothel vor dem „tödlichen Quintett“ schützen. *Dtsch Arztebl International.* 1999;96:2011-.
3. Morbidelli L, Donnini S and Ziche M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des.* 2003;9:521-30.
4. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M and Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med.* 1997;185:601-7.
5. Mallat Z and Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol.* 2000;130:947-62.
6. Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rossig L, Vasa M, Zeiher AM and Dimmeler S. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res.* 2001;89:709-15.
7. Widmer RJ and Lerman A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2014;2014:291-308.
8. Aoi W. Exercise and food factors. *Forum Nutr.* 2009;61:147-155.
9. Stanner S. Diet and lifestyle measures to protect the ageing heart. *Br J Community Nurs.* 2009;14:210-2.
10. Dhingra R and Vasani RS. Age as a risk factor. *Med Clin North Am.* 2012;96:87-91.
11. North BJ and Sinclair DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2012;110:1097-108.
12. Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA and Luscombe NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet.* 2009;10:252-63.
13. Roeder RG. Nuclear RNA polymerases: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription. *Methods Enzymol.* 1996;273:165-71.
14. Frankel AD and Kim PS. Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation. *Cell.* 1991;65:717-9.
15. Luscombe NM, Austin SE, Berman HM and Thornton JM. An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol.* 2000;1:REVIEWS001.
16. Wingender E, Schoeps T, Haubrock M and Donitz J. TFClass: a classification of human transcription factors and their rodent orthologs. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D97-102.
17. Johnson PF, Sterneck E and Williams SC. Activation domains of transcriptional regulatory domains. *J Nutr Biochem.* 1993;4:386-398.
18. Huang P, Chandra V and Rastinejad F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:247-72.
19. Weidemann A and Johnson RS. Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death Differ.* 2008;15:621-7.
20. Frietze S and Farnham PJ. Transcription factor effector domains. *Subcell Biochem.* 2011;52:261-77.
21. Reiter F, Wienerroither S and Stark A. Combinatorial function of transcription factors and cofactors. *Curr Opin Genet Dev.* 2017;43:73-81.
22. Filtz TM, Vogel WK and Leid M. Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends Pharmacol Sci.* 2014;35:76-85.
23. Lukosz M, Jakob S, Buchner N, Zschauer TC, Altschmied J and Haendeler J. Nuclear redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12:713-42.
24. Kohlgruber S, Upadhye A, Dyballa-Rukes N, McNamara CA and Altschmied J. Regulation of Transcription Factors by Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Vascular Physiology and Pathology. *Antioxid Redox Signal.* 2017;26:679-699.
25. Wilson LJ, Linley A, Hammond DE, Hood FE, Coulson JM, MacEwan DJ, Ross SJ, Slupsky JR, Smith PD, Eyers PA and Prior IA. New Perspectives, Opportunities, and Challenges in Exploring the Human Protein Kinome. *Cancer Res.* 2018;78:15-29.

26. Neutzner M and Neutzner A. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination. *Essays Biochem.* 2012;52:37-50.
27. Wang Y and Dasso M. SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122:4249-52.
28. Park JM, Jo SH, Kim MY, Kim TH and Ahn YH. Role of transcription factor acetylation in the regulation of metabolic homeostasis. *Protein Cell.* 2015;6:804-13.
29. Das C and Kundu TK. Transcriptional regulation by the acetylation of nonhistone proteins in humans -- a new target for therapeutics. *IUBMB Life.* 2005;57:137-49.
30. Li N and Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* 1999;13:1137-43.
31. Kim YH, Han ME and Oh SO. The molecular mechanism for nuclear transport and its application. *Anat Cell Biol.* 2017;50:77-85.
32. Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Saunders NF, Curmi PM, Forwood JK, Boden M and Kobe B. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813:1562-77.
33. Green DR and Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature.* 2009;458:1127-30.
34. Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden KH and Oren M. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* 1995;9:2170-83.
35. Kakudo Y, Shibata H, Otsuka K, Kato S and Ishioka C. Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res.* 2005;65:2108-14.
36. Zhang T, Chen C, Breslin MB, Song K and Lan MS. Extra-nuclear activity of INSM1 transcription factor enhances insulin receptor signaling pathway and Nkx6.1 expression through RACK1 interaction. *Cell Signal.* 2014;26:740-7.
37. Zhang T, Liu WD, Saunee NA, Breslin MB and Lan MS. Zinc finger transcription factor INSM1 interrupts cyclin D1 and CDK4 binding and induces cell cycle arrest. *J Biol Chem.* 2009;284:5574-81.
38. Meier JA and Larner AC. Toward a new STATE: the role of STATs in mitochondrial function. *Semin Immunol.* 2014;26:20-8.
39. Gough DJ, Corlett A, Schlessinger K, Wegrzyn J, Larner AC and Levy DE. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science.* 2009;324:1713-6.
40. Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szelag M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu XY, Avadhani N, Drake JI, Fawcett P, Lesnfsky EJ and Larner AC. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science.* 2009;323:793-7.
41. Lufei C, Ma J, Huang G, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Ong CT and Cao X. GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction. *EMBO J.* 2003;22:1325-35.
42. Liu B, Palmfeldt J, Lin L, Colaco A, Clemmensen KKB, Huang J, Xu F, Liu X, Maeda K, Luo Y and Jaattela M. STAT3 associates with vacuolar H(+)-ATPase and regulates cytosolic and lysosomal pH. *Cell Res.* 2018;28:996-1012.
43. Bray SJ and Kafatos FC. Developmental function of E1f-1: an essential transcription factor during embryogenesis in Drosophila. *Genes Dev.* 1991;5:1672-83.
44. Grunhagen DJ, de Wilt JH, Graveland WJ, Verhoef C, van Geel AN and Eggermont AM. Outcome and prognostic factor analysis of 217 consecutive isolated limb perfusions with tumor necrosis factor-alpha and melphalan for limb-threatening soft tissue sarcoma. *Cancer.* 2006;106:1776-84.
45. Zhou A, Scoggin S, Gaynor RB and Williams NS. Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene.* 2003;22:2054-64.
46. Wilanowski T, Tuckfield A, Cerruti L, O'Connell S, Saint R, Parekh V, Tao J, Cunningham JM and Jane SM. A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to Drosophila grainyhead. *Mech Dev.* 2002;114:37-50.

47. Ting SB, Wilanowski T, Cerruti L, Zhao LL, Cunningham JM and Jane SM. The identification and characterization of human Sister-of-Mammalian Grainyhead (SOM) expands the grainyhead-like family of developmental transcription factors. *Biochem J.* 2003;370:953-62.
48. Dereeper A, Audic S, Claverie JM and Blanc G. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol.* 2010;10:8.
49. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM and Gascuel O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:W465-9.
50. Auden A, Caddy J, Wilanowski T, Ting SB, Cunningham JM and Jane SM. Spatial and temporal expression of the Grainyhead-like transcription factor family during murine development. *Gene Expr Patterns.* 2006;6:964-70.
51. Boglev Y, Wilanowski T, Caddy J, Parekh V, Auden A, Darido C, Hislop NR, Cangkrama M, Ting SB and Jane SM. The unique and cooperative roles of the Grainy head-like transcription factors in epidermal development reflect unexpected target gene specificity. *Dev Biol.* 2011;349:512-22.
52. Wang S and Samakovlis C. Grainy head and its target genes in epithelial morphogenesis and wound healing. *Curr Top Dev Biol.* 2012;98:35-63.
53. Ting SB, Caddy J, Hislop N, Wilanowski T, Auden A, Zhao LL, Ellis S, Kaur P, Uchida Y, Holleran WM, Elias PM, Cunningham JM and Jane SM. A homolog of *Drosophila* grainy head is essential for epidermal integrity in mice. *Science.* 2005;308:411-3.
54. Kim M and McGinnis W. Phosphorylation of Grainy head by ERK is essential for wound-dependent regeneration but not for development of an epidermal barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:650-5.
55. Kudryavtseva EI, Sugihara TM, Wang N, Lasso RJ, Gudnason JF, Lipkin SM and Andersen B. Identification and characterization of Grainyhead-like epithelial transactivator (GET-1), a novel mammalian Grainyhead-like factor. *Dev Dyn.* 2003;226:604-17.
56. Guardiola-Serrano F, Haendeler J, Lukosz M, Sturm K, Melchner H and Altschmied J. Gene trapping identifies a putative tumor suppressor and a new inducer of cell migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376:748-52.
57. Ting SB, Wilanowski T, Auden A, Hall M, Voss AK, Thomas T, Parekh V, Cunningham JM and Jane SM. Inositol- and folate-resistant neural tube defects in mice lacking the epithelial-specific factor Grhl-3. *Nat Med.* 2003;9:1513-9.
58. Yu Z, Lin KK, Bhandari A, Spencer JA, Xu X, Wang N, Lu Z, Gill GN, Roop DR, Wertz P and Andersen B. The Grainyhead-like epithelial transactivator Get-1/Grhl3 regulates epidermal terminal differentiation and interacts functionally with LMO4. *Dev Biol.* 2006;299:122-36.
59. Yu Z, Bhandari A, Mannik J, Pham T, Xu X and Andersen B. Grainyhead-like factor Get1/Grhl3 regulates formation of the epidermal leading edge during eyelid closure. *Dev Biol.* 2008;319:56-67.
60. Caddy J, Wilanowski T, Darido C, Dworkin S, Ting SB, Zhao Q, Rank G, Auden A, Srivastava S, Papenfuss TA, Murdoch JN, Humbert PO, Parekh V, Boulos N, Weber T, Zuo J, Cunningham JM and Jane SM. Epidermal wound repair is regulated by the planar cell polarity signaling pathway. *Dev Cell.* 2010;19:138-47.
61. Miles LB, Darido C, Kaslin J, Heath JK, Jane SM and Dworkin S. Mis-expression of grainyhead-like transcription factors in zebrafish leads to defects in enveloping layer (EVL) integrity, cellular morphogenesis and axial extension. *Sci Rep.* 2017;7:17607.
62. Lukosz M, Mlynek A, Czypiorski P, Altschmied J and Haendeler J. The transcription factor Grainyhead like 3 (GRHL3) affects endothelial cell apoptosis and migration in a NO-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412:648-53.
63. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A and Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399:597-601.
64. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601-5.

65. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P and Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. 1996;15:6541-51.
66. Haendeler J, Mlynek A, Buchner N, Lukosz M, Graf M, Guettler C, Jakob S, Farrokh S, Kunze K, Goy C, Guardiola-Serrano F, Schaal H, Cortese-Krott M, Deenen R, Kohrer K, Winkler C and Altschmied J. Two isoforms of Sister-Of-Mammalian Grainyhead have opposing functions in endothelial cells and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1639-46.
67. Polytarchou C, Iliopoulos D, Hatzia Apostolou M, Kottakis F, Maroulakou I, Struhl K and Tschlis PN. Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation. *Cancer Res*. 2011;71:4720-31.
68. Straub T, Knudsen BR and Boege F. PSF/p54(nrb) stimulates "jumping" of DNA topoisomerase I between separate DNA helices. *Biochemistry*. 2000;39:7552-8.
69. Gozani O, Patton JG and Reed R. A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *EMBO J*. 1994;13:3356-67.
70. Patton JG, Porro EB, Galceran J, Tempst P and Nadal-Ginard B. Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev*. 1993;7:393-406.
71. Basu A, Dong B, Krainer AR and Howe CC. The intracisternal A-particle proximal enhancer-binding protein activates transcription and is identical to the RNA- and DNA-binding protein p54nrb/NonO. *Mol Cell Biol*. 1997;17:677-86.
72. Heyd F and Lynch KW. Phosphorylation-dependent regulation of PSF by GSK3 controls CD45 alternative splicing. *Mol Cell*. 2010;40:126-37.
73. Panth N, Paudel KR and Parajuli K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. *Adv Med*. 2016;2016:9152732.
74. Haendeler J, Popp R, Goy C, Tischler V, Zeiher AM and Dimmeler S. Cathepsin D and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate degradation of thioredoxin-1: implication for endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2005;280:42945-51.
75. Zschauer TC, Kunze K, Jakob S, Haendeler J and Altschmied J. Oxidative stress-induced degradation of thioredoxin-1 and apoptosis is inhibited by thioredoxin-1-actin interaction in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:650-6.
76. Kopp W. How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019;12:2221-2236.
77. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230:1350-4.
78. Cuevas EP, Eraso P, Mazon MJ, Santos V, Moreno-Bueno G, Cano A and Portillo F. LOXL2 drives epithelial-mesenchymal transition via activation of IRE1-XBP1 signalling pathway. *Sci Rep*. 2017;7:44988.
79. Evensen NA, Kuscu C, Nguyen HL, Zarrabi K, Dufour A, Kadam P, Hu YJ, Pulkoski-Gross A, Bahou WF, Zucker S and Cao J. Unraveling the role of KIAA1199, a novel endoplasmic reticulum protein, in cancer cell migration. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:1402-16.
80. Oka OB, Pringle MA, Schopp IM, Braakman I and Bulleid NJ. ERdj5 is the ER reductase that catalyzes the removal of non-native disulfides and correct folding of the LDL receptor. *Mol Cell*. 2013;50:793-804.
81. Shan Y and Cortopassi G. Mitochondrial Hspa9/Mortalin regulates erythroid differentiation via iron-sulfur cluster assembly. *Mitochondrion*. 2016;26:94-103.
82. Chen TH, Kambal A, Krysiak K, Walshausser MA, Raju G, Tibbitts JF and Walter MJ. Knockdown of Hspa9, a del(5q31.2) gene, results in a decrease in hematopoietic progenitors in mice. *Blood*. 2011;117:1530-9.
83. Lee AS, Kranzusch PJ and Cate JH. eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature*. 2015;522:111-4.
84. Lee AS, Kranzusch PJ, Doudna JA and Cate JH. eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation. *Nature*. 2016;536:96-9.
85. Masutani M, Sonenberg N, Yokoyama S and Imataka H. Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J*. 2007;26:3373-83.

86. Bladen CL, Udayakumar D, Takeda Y and Dynan WS. Identification of the polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor.p54(nrb) complex as a candidate DNA double-strand break rejoining factor. *J Biol Chem*. 2005;280:5205-10.
87. Akhmedov AT and Lopez BS. Human 100-kDa homologous DNA-pairing protein is the splicing factor PSF and promotes DNA strand invasion. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:3022-30.
88. Altschmied J and Duschl J. Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Biotechniques*. 1997;23:436-8.
89. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M and Yanagawa H. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem*. 2009;284:478-85.
90. Forloni M, Liu AY and Wajapeyee N. Creating Insertions or Deletions Using Overlap Extension Polymerase Chain Reaction (PCR) Mutagenesis. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018.
91. Pop C and Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem*. 2009;284:21777-81.
92. Dong B, Horowitz DS, Kobayashi R and Krainer AR. Purification and cDNA cloning of HeLa cell p54nrb, a nuclear protein with two RNA recognition motifs and extensive homology to human splicing factor PSF and Drosophila NONA/BJ6. *Nucleic Acids Res*. 1993;21:4085-92.
93. Hallier M, Tavitian A and Moreau-Gachelin F. The transcription factor Spi-1/PU.1 binds RNA and interferes with the RNA-binding protein p54nrb. *J Biol Chem*. 1996;271:11177-81.
94. Mathur M, Tucker PW and Samuels HH. PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol*. 2001;21:2298-311.
95. Sewer MB, Nguyen VQ, Huang CJ, Tucker PW, Kagawa N and Waterman MR. Transcriptional activation of human CYP17 in H295R adrenocortical cells depends on complex formation among p54(nrb)/NonO, protein-associated splicing factor, and SF-1, a complex that also participates in repression of transcription. *Endocrinology*. 2002;143:1280-90.
96. Yang YS, Yang MC, Tucker PW and Capra JD. NonO enhances the association of many DNA-binding proteins to their targets. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:2284-92.
97. Kato M, Hata N, Banerjee N, Futch B and Zhang MQ. Identifying combinatorial regulation of transcription factors and binding motifs. *Genome Biol*. 2004;5:R56.
98. Shav-Tal Y and Zipori D. PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett*. 2002;531:109-14.
99. Dye BT and Patton JG. An RNA recognition motif (RRM) is required for the localization of PTB-associated splicing factor (PSF) to subnuclear speckles. *Exp Cell Res*. 2001;263:131-44.
100. Yamamoto R, Osawa T, Sasaki Y, Yamamoto S, Anai M, Izumi K, Matsumura Y, Sakai J, Aburatani H, Mizokami A, Kodama T and Tanaka T. Overexpression of p54(nrb)/NONO induces differential EPHA6 splicing and contributes to castration-resistant prostate cancer growth. *Oncotarget*. 2018;9:10510-10524.
101. Lu JY and Sewer MB. p54nrb/NONO regulates cyclic AMP-dependent glucocorticoid production by modulating phosphodiesterase mRNA splicing and degradation. *Mol Cell Biol*. 2015;35:1223-37.
102. Mora Gallardo C, Sanchez de Diego A, Gutierrez Hernandez J, Talavera-Gutierrez A, Fischer T, Martinez AC and van Wely KHM. Dido3-dependent SFPQ recruitment maintains efficiency in mammalian alternative splicing. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:5381-5394.
103. Luisier R, Tyzack GE, Hall CE, Mitchell JS, Devine H, Taha DM, Malik B, Meyer I, Greensmith L, Newcombe J, Ule J, Luscombe NM and Patani R. Intron retention and nuclear loss of SFPQ are molecular hallmarks of ALS. *Nat Commun*. 2018;9:2010.
104. Dong X, Sweet J, Challis JR, Brown T and Lye SJ. Transcriptional activity of androgen receptor is modulated by two RNA splicing factors, PSF and p54nrb. *Mol Cell Biol*. 2007;27:4863-75.
105. Dong X, Yu C, Shynlova O, Challis JR, Rennie PS and Lye SJ. p54nrb is a transcriptional corepressor of the progesterone receptor that modulates transcription of the labor-associated gene, connexin 43 (Gja1). *Mol Endocrinol*. 2009;23:1147-60.

106. Frisch SM, Farris JC and Pifer PM. Roles of Grainyhead-like transcription factors in cancer. *Oncogene*. 2017;36:6067-6073.
107. Ming Q, Roske Y, Schuetz A, Walentin K, Ibraimi I, Schmidt-Ott KM and Heinemann U. Structural basis of gene regulation by the Grainyhead/CP2 transcription factor family. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:2082-2095.
108. Strambio-De-Castillia C, Niepel M and Rout MP. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:490-501.
109. Freitas N and Cunha C. Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins. *Curr Genomics*. 2009;10:550-7.
110. Chook YM and Suel KE. Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:1593-606.
111. Falces J, Arregi I, Konarev PV, Urbaneja MA, Svergun DI, Taneva SG and Banuelos S. Recognition of nucleoplasmin by its nuclear transport receptor importin alpha/beta: insights into a complete import complex. *Biochemistry*. 2010;49:9756-69.
112. Kondoh K, Terasawa K, Morimoto H and Nishida E. Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2006;26:1679-90.
113. Nardozi JD, Lott K and Cingolani G. Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun Signal*. 2010;8:32.
114. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2018;36:489-517.
115. Fierlbeck W, Liu A, Coyle R and Ballermann BJ. Endothelial cell apoptosis during glomerular capillary lumen formation in vivo. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1349-54.
116. Dimmeler S and Zeiher AM. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res*. 2000;87:434-9.
117. Choy JC, Granville DJ, Hunt DW and McManus BM. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1673-90.
118. Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A and Dimmeler S. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274:6823-6.
119. Rask-Madsen C and King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab*. 2013;17:20-33.
120. Akoumianakis I and Antoniadou C. Impaired Vascular Redox Signaling in the Vascular Complications of Obesity and Diabetes Mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2019;30:333-353.
121. Haendeler J, Weiland U, Zeiher AM and Dimmeler S. Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide*. 1997;1:282-93.
122. Biwer LA, Lechavue C, Vanhoose S, Weiss MJ and Isakson BE. A Cell Culture Model of Resistance Arteries. *J Vis Exp*. 2017.
123. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A and Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*. 1998;392:821-4.
124. Murohara T, Witzensbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW and Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1156-61.
125. Biwer LA, Taddeo EP, Kenwood BM, Hoehn KL, Straub AC and Isakson BE. Two functionally distinct pools of eNOS in endothelium are facilitated by myoendothelial junction lipid composition. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1861:671-9.
126. Marziano C, Hong K, Cope EL, Kotlikoff MI, Isakson BE and Sonkusare SK. Nitric Oxide-Dependent Feedback Loop Regulates Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Channel Cooperativity and Endothelial Function in Small Pulmonary Arteries. *J Am Heart Assoc*. 2017;6.
127. Ottolini M, Hong K and Sonkusare SK. Calcium signals that determine vascular resistance. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2019;11:e1448.
128. Mehta JL, Li DY, Chen HJ, Joseph J and Romeo F. Inhibition of LOX-1 by statins may relate to upregulation of eNOS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;289:857-61.

129. Gonnissen S, Ptok J, Goy C, Jander K, Jakobs P, Eckermann O, Kaisers W, von Ameln F, Timm J, Ale-Agha N, Haendeler J, Schaal H and Altschmied J. High Concentration of Low-Density Lipoprotein Results in Disturbances in Mitochondrial Transcription and Functionality in Endothelial Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:7976382.
130. Ottolini M, Hong K, Cope EL, Daneva Z, DeLalio LJ, Sokolowski JD, Marziano C, Nguyen NY, Altschmied J, Haendeler J, Johnstone SR, Kalani MY, Park MS, Patel RP, Liedtke W, Isakson BE and Sonkusare SK. Local Peroxynitrite Impairs Endothelial TRPV4 Channels and Elevates Blood Pressure in Obesity. *Circulation*. 2020.
131. Darido C, Georgy SR, Wilanowski T, Dworkin S, Auden A, Zhao Q, Rank G, Srivastava S, Finlay MJ, Papenfuss AT, Pandolfi PP, Pearson RB and Jane SM. Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2011;20:635-48.
132. Payne S, De Val S and Neal A. Endothelial-Specific Cre Mouse Models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38:2550-2561.

## Danksagung

Diese Seite ist Allen gewidmet, die mich in den letzten dreieinhalb Jahren begleitet haben, wenn ich sie auch nicht alle namentlich einzeln erwähnen kann.

Ich möchte mich bei PD Dr. Joachim „Yogi“ Altschmied ganz herzlich bedanken für die aufmerksame, intensive Betreuung und Koordination meines Projekts sowie für die Sicherstellung des reibungslosen Ablaufs während meines Aufenthalts in den USA und die stets offene Tür für Sorgen und Nachfragen aller Art. Vielen Dank an Prof. Dr. Judith „Jojo“ Haendeler für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die offenen und konstruktiven Ratschläge für Vorträge, Experimente und Problemstellungen.

Danke an Prof. Axel Gödecke für die Übernahme des Zweitgutachtens. Auch für die Arbeit als Vorsitzender des IRTG 1902 und die fabelhafte Organisation aller wissenschaftlicher und nicht-wissenschaftlicher Zusammenreffen mit anderen Doktoranden und den amerikanischen Austauschpartnern möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein großes Dankeschön an die gesamte Arbeitsgruppe. Im Besonderen möchte ich Steffi danken für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen bei allen GRHL3-Fragen. Fee, Flo und Olaf für alles rund um die Laborarbeit. Philipp und Nadine für das Feintuning meiner Doktorarbeit und die mittagspäusliche Gruppenunterhaltung. Nilo für die offenen Ohren, die Hilfe am Mikroskop und Input bei sämtlichen schriftlichen Belangen. Kathrin und Jan für die tolle Laborzusammenarbeit und Julia für Tee und Gebäck.

Special thanks go to Swapnil Sonkusare for having me in his lab at UVa and giving me the opportunity to perform *in vivo* experiments with state-of-the-art equipment. Corina, thank you for excellent guidance, advice and being the best friend I could have wished for.

Vielen, vielen Dank an das Herzstück des IRTG 1902, Sandra Berger und Janett Schindler, für Antworten auf alle Fragen, die Organisation sämtlicher Events und des Austauschs und die stete Möglichkeit, für alles eine Lösung zu finden. In diesem Sinne auch ein dickes Dankeschön an das amerikanische Pendant, Paul Orange, für die reibungslose Organisation meines Aufenthaltes in den USA vor Ort.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner lieben Schwester Astrid bedanken. Nun sind wir drei promovierte Naturwissenschaftlerinnen in der Familie und ich freue mich auf lebhaftere Diskussionen.